

IMMUNANTWORT BEI PYODERMIEN
ENZYMPRODUKTION VON PYOGENEN
A - STREPTOKOKKEN IN VITRO
KORRELATION ZWISCHEN DER ENZYMSYNTHESE
VON PYOGENENEN A - STREPTOKOKKEN IN VITRO
UND DER IMMUNANTWORT BEI PYODERMIEN

HERBERT BERGHAMMER

1987

Disbui. München

1988



Aus dem Max v. Pettenkofer-Institut der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. F. Deinhardt

IMMUNANTWORT BEI PYODERMIE

ENZYMPRODUKTION VON PYOGENEN
A-STREPTOKOKKEN IN VITRO

KORRELATION ZWISCHEN DER ENZYMSYNTHESE
VON PYOGENEN A-STREPTOKOKKEN IN VITRO
UND DER IMMUNANTWORT BEI PYODERMIE

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnheilkunde
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Herbert Berghammer
aus
Fürstenfeldbruck
1987

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. G. Schiers

Mitberichterstatter: Prof. Dr. F. Deinhardt

Priv.-Doz. Dr. h. c. Korting

**Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:**

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 23.02.1988

Herrn Prof. Dr. G. Schierz danke ich für die Überlassung des Themas und für seine hilfreiche Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. O. Braun-Falco danke ich für seine Mgiße bei der Durchführung dermatologischer Belange.

Frau Dr. B. Wilske danke ich für ihre Ratschläge zur Ausarbeitung des Themas.

Herrn Dr. U. Neubert danke ich für die Betreuung in dermatologischen Angelegenheiten und für die Unterstützung bei der Materialbeschaffung.

Herrn Dr. B. Lorbeer danke ich für die aufopfernde Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Frau K. v. Busch danke ich für ihre Mitarbeit bei der Durchführung der serologischen Tests.

Frau Raith danke ich für die bakteriologische Gruppenbestimmung.

Frau Kühn danke ich für die Ratschläge zur Bedienung des Computers.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555224_0005

INHALTSVERZEICHNIS

1.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
2.	EINLEITUNG	3
2.1.	Einteilung der Streptokokken nach kulturellen und antigenetischen Merkmalen	
2.2.	Durch Streptokokken verursachte Erkrankungen	4
2.2.1.	Streptokokkeninfektionen	
2.2.2.	Streptokokkenfolgekrankheiten	
2.3.	Zellwand- und intrazelluläre Komponenten der A-Streptokokken	6
2.4.	Extrazelluläre Substanzen der A-Streptokokken	8
2.4.1.	Exotoxine	
2.4.1.1.	Streptolysin O	
2.4.1.2.	Streptolysin S	9
2.4.1.3.	Erythrogenes Toxin A, B und C	10
2.4.2.	Exoenzyme	11
2.4.2.1	Hyaluronidase	
2.4.2.2.	Nucleasen	12
2.4.2.3.	Streptokinase	
2.4.2.4.	Nicotinadenindinucleotidase	13
2.4.3.	Weitere extrazelluläre Stoffwechselprodukte	
2.5.	Serologische Nachweisverfahren	
2.6.	Thematik der Untersuchungen	15

3.	MATERIAL UND METHODEN	16
3.1.	Untersuchte Seren	
3.2.	Untersuchte Bakterienstämme	
3.3.	Präparation der Exoenzym-/Exotoxin-Konzentrate	17
3.4.	Serologische Nachweisverfahren	18
3.4.1.	Anti-Streptolysin O-Reaktion (ASR)	
3.4.2.	Anti-Hyaluronidase-Bestimmung (AHy-Test)	21
3.4.3.	Anti-DNase B-Bestimmung (ADNase B-Test)	23
3.4.4.	Anti-Streptokinase-Bestimmung (ASk-Test)	25
3.4.5.	Anti-NADase-Bestimmung als Fluoreszenztest (ANADase-FT)	28
3.5.	Bestimmung der enzymatischen Aktivität der Exoenzymkonzentrate	31
3.5.1.	Bestimmung der Streptolysin O-Aktivität	
3.5.2.	Bestimmung der Hyaluronidase-Aktivität	34
3.5.3.	Bestimmung der DNase B-Aktivität	35
3.5.4.	Bestimmung der Streptokinase-Aktivität	37
	ERGEBNISSE UND DISCUSSION	40
	Erläuterung der klinischen Parameter	
	Alters- und Geschlechtsverteilung	41
	Statistische Analyse	
	Übersicht über alle Testergebnisse	42

4.	IMMUNANTWORT BEI PYODERMIEEN MIT GRUPPE-A STREPTOKOKKEN	44
4.1.	Ergebnisse	
4.1.1.	Verteilung der Antikörperverte	
4.1.2.	Prozentsatz signifikant erhöhter Antikörperverte	45
4.1.2.1.	Bei der Bestimmung nur jeweils eines Ak-Gehaltes	
4.1.2.2.	Bei gleichzeitiger Bestimmung zweier oder mehrerer Antikörpertiter	
4.1.2.3.	Effektivste Testkombination zum serologischen Nachweis von Pyodermien für die Routinediagnostik	46
4.1.3.	Signifikante Mittelwertunterschiede bei verschiedenen klinischen Parametern	54
4.1.3.1.	Signifikanter Mittelwertunterschied der AHyase-Titer bei verschiedenen Bestandsdauergruppen	57
4.1.3.2.	Signifikanter Mittelwertunterschied der ASL O-Titer bei Anwesenheit/Abwesenheit von Staph.aureus	
4.1.3.3.	Signifikanter Mittelwertunterschied der ASL O-Titer bei unterschiedlichem Komplikationsgrad	58
4.1.3.4.	Signifikanter Mittelwertunterschied der AHyase-Titer bei fehlender/vorhandener atopischer Diathese	

4.1.3.5.	Signifikanter Mittelwertunterschied der ASL O-Titer in den unterschiedlichen Altersklassen	59
4.1.3.6.	Signifikanter Mittelwertunterschied der ASk-Titer in den unterschiedlichen Altersklassen	
4.1.4.	Korrelation verschiedener Antikörper	60
4.1.4.1.	Ohne Berücksichtigung klinischer Parameter	
4.1.4.2.	Unter Berücksichtigung klinischer Parameter	62
4.1.4.2.1.	Einfluß des Faktors Begleitkeim	
4.1.4.2.2.	Einfluß des Faktors Ausdehnung	
4.1.4.2.3.	Einfluß der Bestandsdauer der Erkrankung auf den Korrelationsgrad verschiedener Antikörper	64
4.1.4.2.4.	Einfluß des Komplikationsgrades der Erkrankung auf den Korrelationsgrad verschiedener Antikörper	
4.2.	Diskussion	67
4.2.1.	Die Anti-Streptolysin O-Reaktion (ASR) als ungeigneter Seronachweis bei Pyodermien	
4.2.2.	Verteilung der Antikörperverte und ihre Bedeutung für die Serodiagnostik	68
4.2.3.	Einfluß klinischer Parameter auf die Immunantwort	69
4.2.4.	Korrelation der Antikörperverte	72

4.2.4.1.	Ohne Berücksichtigung klinischer Parameter	
4.2.4.2.	Auswirkung klinischer Faktoren auf die Korrelation der Antikörpertiter	73
4.3.	Zusammenfassung	74
5.	ENZYMAKTIVITÄT DER GRUPPE A-STREPTOKOKKEN	76
5.1.	Ergebnisse	
5.1.1.	Verteilung der Enzymmengen	
5.1.2.	Prozentsatz geringer, mittlerer und hoher Enzymproduktion innerhalb der einzelnen Enzymgruppen	77
5.1.3.	Enzymbildungsvermögen der Streptokokken	
5.1.4.	Korrelation zwischen den in vitro produzierten Exoenzym- bzw. Exotoxinnengen	79
5.1.5.	Möglicher Einfluß der Enzymproduktionsfähigkeit auf klinische Parameter	81
5.1.5.1.	Möglicher Einfluß der Streptolysin O-Produktion auf die Bestandsdauer der Erkrankung	
5.1.5.2.	Hyase-Produktion der A-Streptokokken isoliert von Patienten mit oder ohne atopische Diathese	82
5.2.	Diskussion	83
5.2.1.	Enzymproduktion von A-Streptokokken der Haut in vitro	

5.2.2.	Korrelation der in vitro produzierten Enzymmengen	84
5.2.3.	Möglicher Einfluß der Enzymproduktionsfähigkeit auf das Krankheitsbild	
5.3.	Zusammenfassung	85
6.	ZUSAMMENHANG ZWISCHEN DEM ENZYMPRODUKTIONSVERMÖGEN VON GRUPPE A-STREPTOKOKKEN IN VITRO UND DER IMMUNANTWORT BEI PYODERMIE	86
6.1.	Ergebnisse	
6.1.1.	Korrelation ohne Berücksichtigung klinischer Faktoren	
6.1.2.	Korrelation unter Berücksichtigung klinischer Parameter	88
6.1.2.1.	Einfluß des Faktors Begleitkeim	
6.1.2.2.	Einfluß des Komplikationsgrades	89
6.1.2.3.	Einfluß von Begleitkeimen unter Berücksichtigung des Komplikationsgrades	
6.1.2.4.	Einfluß von Begleitkeimen unter Berücksichtigung der Geschlechtsverteilung	
6.1.2.5.	Einfluß des Komplikationsgrades unter Berücksichtigung der Bestandsdauer	
6.2.	Diskussion	94
6.3.	Zusammenfassung	96
7.	ZUSAMMENFASSUNG	97
8.	LITERATURVERZEICHNIS	99

1. ALPHABETISCHES ABBÜHRUNGSVERREICHNIS

ADH	:	Alkoholdehydrogenase
ADNB=ADNase B	:	Anti-Desoxyribonuclease B
AHyase=AHYAL	:	Anti-Hyaluronidase
AK	:	Antikörper
Alt.gr.	:	Altersgruppe
AMADase	:	Anti-Nicotinadenindinucleotidase
ASk	:	Anti-Streptokinase
ASL O	:	Anti-Streptolysin O
ASR	:	Anti-Streptolysin O-Reaktion
Atop.Diat.	:	Atopische Diathese
Ausdehn=Au	:	Ausdehnung
B.A.-Platte	:	Blutagarplatte
Best=Be	:	Bestanddauer
BGl	:	Beriglobin
BKein=Bk	:	Begleitkeim
BSA	:	Bovines Serum-Albumin
CTA	:	Cethyltrimethyl-ammoniumbromid
D	:	Daltons
DNA=DNS	:	Desoxyribonucleinsäure
DNase	:	Desoxyribonuclease
E.	:	Einheit
ELISA	:	Enzym-linked-immuno-sorbet-assay
Erys	:	Erythrocyten
E.T.	:	Erythrogenes Toxin
G	:	Gruppe
Gbrohlag	:	Gebrauchslösung
HAI	:	Hämagglutination-Immunoassay
H.E.	:	Hämolytische Einheit
HLA	:	Human lymphocyte antigen system A
Hyase=Hyal	:	Hyaluronidase
Hysäure	:	Hyaluronsäure
I.E.=I.U.	:	Internationale Einheit
Komplik=Ko	:	Komplikationsgrad
Kons.	:	Konzentration
Korr.K.	:	Korrelationskoeffizient



LIF	:	Lymphocyte migration inhibition factor
MG	:	Molekulargewicht
MW	:	Mittelwert
NAD	:	Nicotinadenindinucleotid
NADase	:	Nicotinadenindinucleotidase
PBS	:	Phosphatpufferlösung, pH 7,3
Pn	:	Patienten
p-Wert	:	Irrtumswahrscheinlichkeit
Sd	:	Standard
Se	:	Serum
Sex=Sx	:	Geschlecht
sign.	:	signifikant
Sk	:	Streptokinase
Sl	:	Streptolysin
TNB	:	Todd-Hewitt-Bouillon
U/ml	:	Unit pro ml
U/min	:	Umdrehnungen pro Minute
Vd	:	Verdünnung
Vdfaktor	:	Verdünnungsfaktor

2. Einleitung

2.1. Einteilung der Streptokokken nach kulturellen und antigenetischen Merkmalen

Streptokokken sind grampositive, kugelige bis ovale, in Ketten gelagerte, in der Regel unbewegliche Bakterien, die für Mensch und Tier pathogen sein können.

Auf Grund ihrer hämolytischen Eigenschaften unterteilt man sie in alpha-hämolyzierende Streptokokken (vergrünende oder viridans-Streptokokken mit unvollständiger Hämolyse), beta-hämolyzierende Streptokokken (Streptokokken mit vollständiger Hämolyse) und gamma-hämolyzierende Streptokokken (nicht hämolyzierende Streptokokken).

Neben diesen kulturellen Eigenschaften werden auch antigenetische Merkmale zur Differenzierung der Streptokokken verwendet. So basiert die Einteilung der Streptokokken in die Serogruppe A-T nach Lancefield auf unterschiedlichen Kohlenhydratantigenen in der Zellwand der Streptokokken. Zur Bestimmung der Serogruppe kann dieser Zellwandbestandteil u.a. durch Behandlung des Kultursediments mit heißer Salzsäure (Methode nach Lancefield), Formamid (Methode nach Fuller), salpetriger Säure oder aber durch enzymatische Lyse der Streptokokken (z.B. mit Trypsin, Pepsin oder Enzymen von *Streptomyces albus*) extrahiert werden. Dieses Antigenextrakt wird vermisch mit einem Immuns serum, das von Kaninchen stammt, die mit Formalin-behandelten Kulturen zur Antikörperbildung angeregt wurden. Stimmen Antigenextrakt und Spezifität des Immuns erums bezüglich der Serogruppe überein, erfolgt eine Präzipitation.

Für die serologische Spezifität dieses Kohlenhydratantigens ist ein Aminosucker bestimmend, so z.B. Rhamnose-N-Acetylglucosamin für die Gruppe A. Mittels der Gruppenzugehörigkeit können Aussagen über die Pathogenität gegenüber bestimmter Wirtsorganismen gemacht werden. So sind Streptokokken der Serogruppen A, B, C, D, F, G, H, K, und L für den Menschen pathogen, wobei über 90 Prozent aller Streptokokkeninfektionen des Menschen durch beta-hämolyzierende

Streptokokken der Gruppe A hervorgerufen werden. (36)
Die Serogruppe A kann auf Grund von verschiedenen Protein-
antigenen, die auch Bestandteile der Zellwand sind, in M-,
T- und R-Typen weiter unterteilt werden. (74, 86)
Hierbei kommt vor allem dem M-Protein, das zur Unterschei-
dung von 65 M-Typen benötigt wird, eine große Rolle in der
Virulenz beta-hämolysierender Streptokokken der Gruppe A
zu. (40, 51, 55, 61, 65, 73, 81, 85)

2.2. Durch Streptokokken verursachte Erkrankungen

Die durch Streptokokken verursachten Erkrankungen lassen
sich in unmittelbare Streptokokkeninfekte und Strepto-
kokkenfolgekrankheiten einteilen:

2.2.1. Streptokokkeninfektionen

Zu der Vielzahl der durch Streptokokken bedingten Infekte
zählen u.a.: Infektionen im Hals-, Nasen- und Ohrenbereich,
wie z.B. akute und chronische Tonsillitis, Peritonsillar-
abszeß, Sinusitis, Otitis media, Mastoiditis;
ferner Osteomyelitis, Phlegmonen, Pneumonien, Pyodermien,
Infektionen nach Verletzungen, Puerperalsepsis, Meningitis,
Scharlach, Erysipel und Harnwegsinfektionen. Bei diesen
Erkrankungen lassen sich die Erreger meist direkt mit
mikroskopischen oder kulturellen Methoden nachweisen.
Die Erkrankungen können dann in erster Linie durch das
charakteristische klinische Erscheinungsbild und durch den
direkten bakteriologischen Nachweis diagnostiziert werden.

2.2.2. Streptokokkenfolgekrankheiten

Durch wiederholte Infektionen mit beta-hämolysierenden
Streptokokken der Gruppe A wird mit großer Wahrscheinlich-
keit aber auch noch eine zweite Krankheitsgruppe verur-
sacht, die als Streptokokkenfolgekrankheiten bezeichnet
wird. Zu ihr zählen das akute rheumatische Fieber, die
akute Glomerulonephritis, Endocarditis und das Erythema
nodosum des Erwachsenen.

Bei diesen Krankheiten läßt sich am Ort der Erkrankung kein bakteriologischer Erregernachweis erbringen. Obwohl den Streptokokkenfolgeerkrankungen eine Streptokokkeninfektion vorausgeht,

-beim akuten rheumatischen Fieber ist dies meist eine Infektion des oberen Respirationstraktes mit A-Streptokokken ein bis vier Wochen vor Ausbruch der rheumatischen Erkrankung, bei der akuten Glomerulonephritis meist ein Hautinfekt mit A-Streptokokken der M-Typen 4, 12, 49, 59, 60 und 61 ca drei Wochen vor den ersten klinischen Symptomen (36, 40, 65)- werden diese Krankheiten nicht durch direkte, cytotoxische oder enzymatische Aktivitäten der Streptokokken verursacht, sondern wahrscheinlich durch immunpathologische Veränderungen.

Der genaue Entstehungsmechanismus dieser "Nachkrankheiten" ist unklar. Es handelt sich wohl um ein komplexes Geschehen bei dem folgende Faktoren eine Rolle spielen können:

Einige extra- und intrazelluläre Toxine der A-Streptokokken, wie Streptolysin O, Streptolysin S, Proteinase, Nephrotoxin und Nephritis-associated protein, sowie "Endotoxin"-Mucopolysaccharidkomplexe und die Ablagerung von Antigen-Antikörper-Komplement-Komplexen können eine Vor-schädigung der betroffenen Gewebe (s.u.) verursachen.

Kreuzreagierende Streptokokkenantigene, die ähnliche oder identische Epitope wie die erkrankten humane Gewebe besitzen, -so z.B. ähneln das M-like-protein und die N-Acetylglucosamine der Streptokokkenzellwand dem Sarkolemm und dem Herzklappen-gewebe, die Hyaluronsäure der Synovia und bestimmte Zellmembranantigene der Glomerulibasalmembran, den Epithelzellen des Endokards und bestimmten HLA-Antigenen- können die Bildung von kreuzreagierenden Antikörpern induzieren, die dann Autoimmunphänomene verursachen.

Gleichzeitig können polyklonale Zellaktivatoren, via Unterdrückung der T-Suppressorzellfunktion, ebenfalls eine Immunantwort (der B-Zellen) gegen autologe Antigene begünstigen bzw. verursachen und Streptokokken-Mitogene können die Lymphozyten zur verstärkten Proliferation und LIF-Produktion anregen.

Wichtig für das Zustandekommen dieser abnormen Immunantwort scheint jedoch auch ein genetischer Faktor zu sein, was sich in einer starken Verminderung der HLA-Antigene bei Patienten mit rheumatischem Fieber zeigt (8, 32, 34, 36, 67, 79). Zur Gruppe der Streptokokkenfolgeerkrankungen werden von manchen Autoren auch Lupus erythematoses und Chorea minor gerechnet.

Zur Diagnostik dieser "Nachkrankheiten" sind das klinische Erscheinungsbild, entsprechende Laborparameter (z.B. Proteinurie, Erythrozyturie und Erythrozytenzylinder bei akuter Glomerulonephritis) maßgeblich, sowie der Nachweis überhöhter Antikörpertiter gegen bestimmter extrazelluläre Antigene, Toxine und Enzyme der Streptokokken und das Auftreten von Agglutinationsreaktionen im Serum von Patienten, die an rheumatischem Fieber erkrankt sind.

2.3. Zellwand- und intrazelluläre Komponenten der A-Streptokokken

Einen Überblick über die verschiedenen Zellwand- und intrazelluläre Komponenten der A-Streptokokken gibt die Tabelle 1a.

Mit Ausnahme der Hyaluronsäure sind alle Zellbestandteile antigen wirksam. (36) Besondere Bedeutung für die Virulenz der Streptokokken besitzen wahrscheinlich nur das M-Protein, dessen Phagozytose-hemmende Aktivität etwa tausendmal so groß ist wie die der Hyaluronsäurekapsel; das Mucopепtid, das als einziger zellulärer Faktor eine ausgeprägte toxische Wirksamkeit aufweisen soll und das bereits oben erwähnte kreuzreagierende Antigen. Die übrigen antigen wirksamen zellulären Komponenten haben bisher v.a. bei der Einteilung der Streptokokken in Gruppen und Untergruppen Bedeutung erlangt. Weiterhin kann durch sog. Antigen-detection-tests mit großer Zuverlässigkeit das Vorliegen einer echten Streptokokkeninfektion, z.B. bei Pharyngitiden, in wenigen Minuten festgestellt werden und so eine unnötige Antibiotikatherapie vermieden, bzw. eine nötige schnelle Therapie eingeleitet werden. (26, 30, 36, 40)

KAPSEL:	Hyaluronsäure	EXOTOXINE:
ZELLWAND:	M-/ T-/ R-Protein Teichonsäure C-Carbohydrat Mucopепtid	Streptolysin O und S Erythrogenes Toxin A/B/C Nephrotoxin Cardiohepatische Toxine
ZELLMEMBRAN:	Proteine, Lipasen Glucose kreuzreagierendes Antigen	ENZYMEN: Hyaluronidase DNase A, B, C und D Streptokinase (4 Isoenzyme) NADase Proteinase Polysaccharidase Glucuronidase Ribonuklease Mitogen Zellsensibilisierender Faktor
INTRAZELLULÄRE KOMPONENTEN:		
Zellorganelle:	Mesosomen, Ribosomen, Nucleoid	
Körpersubstanz:	Nucleoprotein	
Enzyme:	Phosphatase Lipoproteinase Dehydrogenase Glucuronidase Esterase, Amylase Intrazelluläre Hämolysine	

Tab. 1a: Zellwandkomponenten und intrazelluläre Komponenten von Gruppe A Streptokokken

Tab. 1b: Extrazelluläre Produkte der A-Streptokokken

2.4. Extrazelluläre Substanzen der A-Streptokokken

Im Gegensatz zu den intrazellulären Komponenten ist den unterschiedlich toxisch und antigen wirksamen extrazellulären Stoffwechselprodukten schon lange große pathologische Bedeutung beigemessen worden und die gegen sie gerichteten Antikörper in den Sera der Erkrankten werden schon seit Jahren zur serologischen Diagnostik herangezogen.

2.4.1. Exotoxine

Zu den wichtigsten Streptokokkenexotoxinen zählen die Streptolysine:

2.4.1.1. Streptolysin O (SL O):

Streptolysin O ist ein sauerstoffempfindliches Enzym, das in reduzierter Form, d.h. beim Vorhandensein freier SH-Gruppen, Erythrozyten zerstört, kardiotoxisch ist und Lysosomen, polymorphkernige Leukozyten, Mitochondrien und Fibroblasten schädigt. Streptolysin O ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von 53000-75000 Daltons, von dem möglicherweise zwei Formen existieren (11). Die produzierte SL O-Menge kann bis zu 7,5 % aller extrazellulären Proteine betragen (17) und ist M-Typen abhängig -so weist der M3 Typ eine hohe SL O-Bildung auf-.

Die Zellschädigungen durch SL O werden wahrscheinlich durch eine irreversible, temperaturunabhängige aber thiolabhängige Bindung der F-Bindungsstelle der SL O-Moleküle an das Cholesterol von Zellmembranen eingeleitet, der sich die eigentliche temperaturabhängige und thiolunabhängige Zellyse durch die T-Stelle anschließt.

Der Mechanismus der Lyse ist unklar. Obwohl elektronenmikroskopisch Kanal- und Lochbildungen bei Erythrozyten durch SL O nachgewiesen wurden, sind auch osmotische Mechanismen beschrieben worden (101). Zellen deren Membranen ohne Sterol aufgebaut sind, z.B. Protoplasten, werden durch SL O nicht zerstört.

Zur Lyse eines Erythrozyten werden nur etwa hundert SL O-Moleküle benötigt, wobei sich maximal 1500 SL O-Moleküle an einen Erythrozyten anlagern können und dabei nur 1/1000 der Erythrozytenoberfläche belegen. (11)

Die Herzschiädigung erfolgt wahrscheinlich über Acetylcholinfreisetzung im Antrum.

Streptolysin O induziert beim Menschen die Bildung spezifischer Antikörper (Antistreptolysin O), die sich wohl gegen F- und T-Stellen richten. Streptolysin O kann sowohl durch diese spezifischen Antikörper gehemmt werden, als auch durch unspezifische Antistreptolysinfaktoren, die vor allem in ikterische oder lipämischen Seren auftreten und sich nur an die T-Stellen binden sollen. Zu diesen unspezifischen ASL O-Faktoren zählen beta-Lipoproteine, freies -d.h. nicht verestertes oder an Protein gebundenes- Cholesterol sowie verwandte Sterole mit einer beta-OH-Gruppe in C3 Position. (1, 10, 11, 17, 30, 67, 83, 93, 95, 96, 100, 101, 102)

2.4.1.2. Streptolysin S (SL S)

Im Gegensatz zu SL O ist Streptolysin S oxydationsstabil und primär ein zellgebundenes Hämolyysin. Die extrazelluläre Freisetzung von SL S erfolgt in Gegenwart großer Moleküle, z.B. bei Anwesenheit von Polyribonucleotiden, Albumin, Serumproteinen oder nichtionischen Detergentien, die als Träger des aktiven Teiles von SL S fungieren. Wahrscheinlich wegen der geringen Größe dieses aktiven Teils, er besteht aus ca. 17 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von nur etwa 3000 D, besitzt SL S keine Antigenität.

SL S zerstört u.a. Erythrozyten, Lysosome, Leukozyten, Mitochondrien, Zellkerne, eukaryontische Zellen und auch einige Bakteriensellwände, z.B. von *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus faecalis*, durch Veränderung der Zellpermeabilität (Wasser strömt in die Zellen).

Ferner führt SL S im Tierversuch zu einer Schädigung von Herzmuskelsellen und ist für die Hämolysezone auf Blutagarplatten rund um die Streptokokkenkolonien verantwortlich.

Von allen Hämolytinen oder hämolytinähnlichen Substanzen, die von einer Vielzahl von Bakterien gebildet werden, besitzt SL S mit 2000000 Hämolytischen Einheiten (H.E.) pro mg die höchste spezifische Aktivität (im Vergleich dazu hat SL O 600 000 H.E./mg, Clostridium perfringens alpha-Toxin 10 000 H.E./mg und Saponin 32 H.E./mg). SL S ist hitze- und säurelabil und wird durch Phospholipide inaktiviert. (10, 30, 39, 95, 96, 100, 101)

2.4.1.3. Erythrogenes Toxin A, B und C (E.T.)

Als drittes Exotoxin wird von lysogenen Streptokokkenstämmen, d.h. von Streptokokken die das Genom eines temperierten Phagen besitzen, sowie von Streptokokken, die durch Bakteriophagen in einen pseudolyso-genetischen Zustand versetzt wurden (ohne Integration des Genoms), das Erythro-gene Toxin gebildet. Es existieren mindestens drei antigene-tisch verschiedene Varianten A, B und C, mit Molekularge-wichten von 5500-8500 (A), 21900 (B) und 13200 (C) Daltons. Sie sollen aus einem hitzelabilen Protein, das für die primäre Toxizität verantwortlich gemacht wird und einem hitzestabilen Protein, das bei allen drei Varianten gleich sein soll und die sekundäre Toxizität bewirken soll, aufgebaut sein. Als Träger funktioniert Hyaluronsäure, die mit den Toxin nicht kovalent verbunden ist. Ausdruck der primären Toxizität ist die Schädigung von Herz- und Leberzellen, Fieber -durch Freisetzung von Pyrogenen aus Granulozyten-, Immunsuppression, die Unterdrückung des Reticuloendothelialen Systems, die leukotoxische Aktivität und eine Erhöhung der Empfangsbereitschaft des erkrankten Organismus für SL O und den Endotoxinschock. Die sekundäre Toxizität soll über eine hypersensitive Reaktion vom verzögerten Typ, eine Rötung der Haut, das Scharlacheranthem, verursachen. Primäre und sekundäre Toxizität sollen sich gegenseitig verstärken. So tritt z.B. das Exanthem nicht auf, wenn das hitzelabile Protein durch Antitoxin neutralisiert wird und somit das Gewebe nicht mehr auf die sekundäre Toxizität vorbereiten kann.

Um die spezifische Natur des Scharlachexanthems nachzuweisen, wird heute meist ein gegen Erythrogenes Toxin spezifisches Antitoxin in die exanthemische Hautpartie injiziert, welches ein Verblässen der Rötung in diesem Gebiet bewirkt, sofern das Exanthem durch das E.T. der Streptokokken hervorgerufen wird (Schulz-Charlton-Reaktion).

Der Dick-Test, als Nachweis für die Empfänglichkeit für E.T., bei dem verdünnte Toxinlösungen nach subkutaner Injektion ein Erythem und ein Ödem bewirken, sofern die Antitoxinkonzentration im Serum unter dem Schwellenwert liegt, wird heute nicht mehr durchgeführt. Daneben besteht die Möglichkeit, E.T. quantitativ über ELISA und HAI zu bestimmen. (30, 40, 46, 101)

2.4.2. Exoenzyme

Neben diesen Exotoxinen produzieren A-Streptokokken auch eine Vielzahl von Exoenzymen, die wie SL O und SL S vorwiegend in der logarithmischen Wachstumsphase gebildet werden.

2.4.2.1. Hyaluronidase (Hyase)

Die Hyaluronidase ist ein Glycoprotein mit einem MG von ca. 70 000 D und kann Hyaluronsäure -als wichtigsten Bestandteil des Bindegewebes- spalten. Obwohl eine virulenzsteigernde Wirkung durch Hyaluronidase (Hyase) als "spreading factor " beschrieben wurde (19, 23), ist es fraglich, ob die Ausbreitung der Streptokokken durch Hyase begünstigt wird (51). Andererseits wird der Hyase eine virulenzhemmende Wirkung zugeschrieben, durch Phagozytoseförderung mittels Dekapsulierung der Hyaluronsäurekapsel (38, 43). Nach Ansicht von Pike soll die Hyase aber erst dann freigesetzt werden, wenn die Hyaluronsäurekapsel bereits verloren gegangen ist (66).

Therapeutisch wird Hyase benutzt, um die Ausbreitung und Resorption von Flüssigkeiten, die ins Gewebe injiziert wurden, zu erleichtern. Hyase bewirkt beim Menschen die Bildung spezifischer Antikörper (Antihyaluronidase). (5, 6, 27, 37, 75, 76)

2.4.2.2. Nucleasen

Ebenso antigen wirksam sind die Nucleasen. In unterschiedlich hohem Prozentsatz werden vier Isoenzyme gebildet, die sich hinsichtlich der Hitzeempfindlichkeit, der elektrophoretischen Beweglichkeit, des pH-Optimums, der Substratspezifität und der Präferenz der Internukleotidspaltung unterscheiden. So depolymerisieren die Desoxyribonukleasen A und C nur Desoxyribonukleinsäure an der 3'Phosphatbindung, während die Desoxyribonucleasen B und D auch Ribonukleaseaktivität besitzen. Den Nukleasen, die ein MG von 25 000 - 30 000 D besitzen, wird die Fähigkeit zugeschrieben, durch Verflüssigung eitriger Exudate die Ausbreitung der Streptokokken zu beschleunigen. Therapeutisch werden Gemische von Streptokokken-DNase und Streptokinase verwendet, um die Viskosität eitriger Exudate zu verringern. Dadurch wird die Entfernung des Eiters und des nekrotischen Gewebes erleichtert und antibiotische Substanzen können besser zur Wirkung. (31, 53, 87, 98)

2.4.2.3. Streptokinase (Sk)

Auch von der Streptokokken-Streptokinase existieren mindestens vier Isoenzyme (MG ca. 45 000), deren aktive Zentren gleich oder zumindest sehr ähnlich sind und Plasminogen menschlichen Serums in Plasmin überführen. In Tierversuchen verstärkt Streptokinase in Gegenwart menschlichen Plasmins die Pathogenität der Streptokokken. Therapeutisch wird sie bei arteriellen und venösen Verschlusskrankheiten eingesetzt, wenn die Antikörpertiter gegen Streptokinase nicht zu hoch sind. (16, 20, 28, 29, 62, 90, 94, 100)

2.4.2.4. Nicotinadenindinucleotidase (NADase)

Desweiteren bilden Streptokokken der Gruppen A, C und G Nicotinadenindinucleotidasen, (MG ca. 55 000), das NAD hydrolytisch an der Nicotinamureamid-Ribose-Bindung spaltet. NADase hemmt den oxydativen Stoffwechsel der Mitochondrien von Kaninchen-/Meerschweinchen-Herzmuskelzellen. Obwohl ihm die Fähigkeit Leukozyten abzutöten zugesprochen wird, ist die Rolle der NADase bei der Gewebsschädigung unklar. Wie die Streptokinase ist auch NADase antigen wirksam. (33, 45, 63, 80, 92)

2.4.3. Weitere extrazelluläre Stoffwechselprodukte

Als weitere extrazelluläre Stoffwechselprodukte kennt man *Ribonuklease*; *Polysaccharidase*; *Glucuronidase*; *Proteinase*; *Nitogen*, das möglicherweise Zellschäden an autologen Zellen durch Lymphozytenstimulation oder Freisetzung von Toxinen aus Lymphozyten verursacht (siehe 2.2.);

Zellsensibilisierender Faktor, der Erythrozyten und Leukozyten zur Lyse durch Antikörper und Komplement sensibilisiert (siehe 2.2.); *Nephrotoxin*, das Hämaturie, Albuminurie und Bluthochdruck hervorruft; sowie *Cardiohepatische Toxine*, die sehr hitzeresistent sind und Schäden an Herz- und Leberzellen bewirken. (30, 32, 36, 40, 51)

2.5. Serologische Nachweisverfahren von Streptokokkenkrankungen

Die Mehrzahl der oben aufgeführten extrazellulären Substanzen induziert die Bildung von Antikörpern. Zur Serodiagnostik streptokokken-bedingter Erkrankungen werden aber meistens nur die Antikörpertiter gegen SL O, Hyase, DNase B, SK und NADase im Serum bestimmt.

Die Zeit bis zum Einsetzen der Immunantwort ist für die einzelnen Antikörper unterschiedlich und hängt auch von der Art der Infektion ab:

So läßt sich in der Regel ein ASL O-Titeranstieg in der zweiten bis dritten Woche nach einer Streptokokkeninfektion nachweisen, beim rheumatischen Fieber etwas später, bei Tonsillitis meist früher. Während die ASL O-Titer schon am 10.-15. Infektionstag maximal sind, ist dies bei der AHase meist erst nach drei Wochen und bei der ADHase B nach vier Wochen der Fall. (35, 51, 70, 89, 91)

Die *Höhe der einzelnen Antikörpertiter* wird aber nicht nur durch den *Zeitfaktor* beeinflusst, sondern auch in unterschiedlichem Ausmaß durch

das *Alter* des Erkrankten (junge Kinder und alte Menschen sollen niedrigere Titer aufweisen),

Jahreszeit und Region (je wärmer und feuchter das Klima, umso höher die Antikörpertiter),

und die *soziale Schicht* des Erkrankten, im Zusammenhang mit der *Häufigkeit von Streptokokkeninfektionen*. (91, 99)

Daneben wurde für *einzelne Antikörper* eine Abhängigkeit der Titer

von der *Ort der Streptokokkeneinwirkung* (geringer ASL O-Anstieg bei Hautinfektionen, vermutlich ausgelöst via Hemmung der SL O-Aktivität durch Cholesterin der Haut),

von der *Dauer der Bakterieneinwirkung* (AHase-Titer sind bei langanhaltenden Infekten höher),

von der *Virulenz der Erreger, den Milieufaktoren des Wirtes und dem unterschiedlichen Toxin-/Exoenzymbildungsvermögen der einzelnen Stämme* festgestellt.

(3, 12, 41, 52, 57, 91, 93, 99, 106)

Einige dieser Faktoren könnten auch der Grund dafür sein, daß trotz gesicherter Streptokokkeninfektion (mittels bakteriologischen und kulturellen Nachweis) es zum *Ausbleiben eines Antikörpertiteranstieges* kommen kann. Für ASL O trifft dies in 15-45 % aller Fälle zu (41, 90, 91), weshalb bei Verdacht auf eine Streptokokkeninfektion die alleinige Durchführung der ASL O-Reaktion (ASR) ungerechtfertigt erscheint (4, 41, 47, 91) und bei negativer ASR auch noch andere Antikörpertests durchgeführt werden sollten.

Unspezifische Reaktionen

Daneben kann es aber auch zu unspezifischen Reaktion bei der Durchführung der Antikörpertests kommen. So führen Lipide oder Lipoproteine in hämolytischen, lipämischen, ikterischen und bakteriell verunreinigten Seren zu unspezifisch erhöhten ASL O-Titern. Dies läßt sich aber durch Dextranfällung der Seren vermeiden.

Ein Erhitzen der Seren für 30 Minuten bei 56 Grad Celsius inaktiviert die nicht spezifischen Hyaluronidase- und Plasminogeninhibitoren sowie die Nukleasen A, C und D, wodurch unspezifisch erhöhte AHase-, ASk- und ADNase B-Titer vermieden werden. (16, 24, 29, 44, 64, 68, 89, 90, 102) Die serologische Aussagefähigkeit der Antikörperrnachweisverfahren kann weiterhin eingeschränkt sein, wenn der Patient unter angeborenen oder erworbenen Immundefekten, z.B. durch Strahlenschäden oder Neoplasien, leidet.

2.6. Thematik der Untersuchungen

Im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen wurden folgende drei Fragestellungen bearbeitet:

1. *Welche Immunantwort erhält man im Zuge eitriger Hautinfektionen durch Streptokokken der Serogruppe A?* Hierzu sollen Höhe und Verteilung der ASL O-, AHase-, ADNase B-, ASk- und ANADase-Titer unter Berücksichtigung klinischer Parameter sowie die effektivste Testkombination festgestellt werden.

2. *Welche Enzymaktivität besitzen Streptococcus pyogenes Stämme, die eitrige Hautinfektionen verursachen?* Hierzu sollen die SL O-, Hyase-, DNase B- und Sk-Aktivität der isolierten Stämme bestimmt werden.

3. *Besteht ein Zusammenhang zwischen der Enzymaktivität der isolierten Stämme in vitro und der humoralen Immunantwort?*

3. Material und Methoden

3.1. Untersuchte Seren

Untersucht wurden 63 Seren von Patienten der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München. Alle 63 Patienten litten an eitrigen Hautinfektionen durch A-Streptokokken. 11 Patienten waren zur Zeit der Blutentnahme zwischen 7 und 18 Jahre alt, 38 Patienten waren im Alter von 19-50 Jahren und 14 waren älter als 50 Jahre.

Alle Seren wurden für 30 Minuten bei 56 Grad C inaktiviert, anschließend in fünf Portionen aufgeteilt und bis zur Versuchsdurchführung bei -20 Grad C aufbewahrt.

3.2. Untersuchte Bakterienstämme

63 Bakterienstämme wurden aus Wundabstrichen obiger Patienten gewonnen. Die Zugehörigkeit zur Serogruppe A wurde durch den Bacitracin-Test und durch einen Agglutinationstest (Slidex Strepto-kit) gesichert.

Die isolierten Stämme wurden auf Blutagarplatten ausgestrichen und 24 Stunden bei 37 Grad C inkubiert. Anschließend wurden je fünf Kolonien in Todd-Hewitt-Bouillon überimpft und ebenfalls 24 Stunden bei 37 Grad C inkubiert und erneut auf Blutplatten die Reinheit der Kultur überprüft. Bis zur Durchführung der Exoenzym-/Exotoxin-Nachweise wurden die Stämme nach dem Gefriertrocknungsverfahren von H.Eyer lyophilisiert:

Dazu wurden den Blutplatten 1-5 Einzelkolonien entnommen und in 1 ml fötalem Kübberserum, dem 1g Saccharose zugesetzt wurde, verrieben. Von dieser Aufschwemmung wurden je 1-2 Tropfen auf 2 sterile Watteröhrchen gegeben, die dann in sterilen Ampullenfläschchen unter Vakuum verschlossen und versiegelt wurden.

3.3. Präparation der Exoenzym-/Exotoxin-Konzentrate

Zur Herstellung der Exoenzym-/Exotoxin-Konzentrate wurden die Lyophilisate 24 Stunden in THB inkubiert, um anschließend den Stamm auf einer B.A.-Platte auszustreichen und wieder 24 Stunden bei 37 Grad zu inkubieren.

Nach der Inkubation wurden 5 Kolonien in 20 ml dialysierter THB überimpft, 24 Stunden bei 37 Grad C inkubiert und die erhaltenen Kulturen 30 Minuten bei 3500 U/min zentrifugiert. Die Sedimente wurden dann auf B.A.-Platten überimpft, um die Reinheit der Kulturen zu kontrollieren. Die Überstände wurden mit Spritze und aufgeschraubten Sterilfiltern (Porengröße 0,0002 mm) sterilfiltriert. Zur Sterilitätskontrolle wurden die Sterilfiltrate auf B.A.-Platten ausgestrichen.

Anschließend wurden 15 ml der Sterilfiltrate bei 4 Grad C (im Kühlschrank) mittels Minicon B 15 Konzentratoren * (78) 25-fach eingengt und die Konzentrate zu je 5 Portionen bei -70 Grad C bis zur weiteren Testung eingefroren.

Nach Tiesler und Mitarbeiter (93) ist die verwendete Einsatzmenge unerheblich für die erhaltene Enzym-/Toxinmenge. Es erfolgt keine Beeinträchtigung durch Seitzfiltration (23, 24, 94). Die Enzymkonzentrate erleiden bei -70 Grad C über Jahre keinen Aktivitätsverlust (37, 68, 98).

Um identische Bedingungen bei der Enzymproduktion zu erhalten, wurde eine Inkubationsdauer von 24 Stunden gewählt, obwohl die DNase B-Menge schon nach 18 Stunden maximal ist, während die Hyase-Konzentration oft erst nach 36 Stunden ihren Höhepunkt erreicht. (51, 94)

Verwendete Materialien

THB von Oxoid (R): 100 ml enthalten: 10.0 g fettfreies Rindfleischextrakt, 20.0 g Trypton, 2.0 g Dextrose, 2.0 g NaCl, 2.0 g NaHCO₃, 0.4 g Na₂HPO₃.

Slidex Strepto-kit Bio Merieux Würtingen.

Minisart Filter von Fa. Sartorius: Porengröße 0.0002 mm.

*Minicon B 15 Konzentratoren von Fa. Amicon Corp. Danvers.

Dialysierte THB: THB wurde in Dialysierschläuchen, deren Ausschlußgröße bei 10 000-20 000 D liegt, gegen steriles Aqua dest. zur Entfernung makromolekularer Bestandteile dialysiert.

Visking-Dialysierschläuche 36/32 von Fa Serva: Porendurchmesser 15-20 Angström, Ausschlußgrenze 10 000-20 000 D

3.4. Serologische Nachweisverfahren

3.4.1. Anti-Streptolysin O-Reaktion (ASR)

In dieser Studie erfolgte der Nachweis von Antistreptolysin O im Serum durch Hämolysehemmung mit den Reagenzien der Behringwerke nach Vorschrift. Dieser Toxinneutralisationstest, dessen Prinzip bereits 1932 von Todd (95) beschrieben wurde, ist leicht durchführbar und durch standardisierte Reagenziensätze international vergleichbar.

3.4.1.1. Testprinzip des Toxinneutralisationstests

Die quantitative Bestimmung des ASL O-Titers im Serum beruht auf der Tatsache, daß Streptolysin O Schaf-Erythrozyten hämolysiert und die Hämolyse durch die neutralisierende Wirkung von spezifischen Antikörpern verhindert werden kann. Dem in einer Verdünnungsreihe vorliegenden Serum wird eine standardisierte Menge reduziertes Streptolysin O zugesetzt. Im Serum vorhandene Antikörper reagieren in einer Antigen-Antikörper-Reaktion mit dem SL O. Anschließend werden Testerythrozyten zugegeben. Ausbleibende Hämolyse weist auf vorhandenes ASL O hin.

Unter dem ASL O-Titer im Serum versteht man den Reziprokwert der letzten Verdünnungsstufe mit ausbleibender Hämolyse. Der ASL O-Gehalt eines Serums wird aus den Titern des Patientenserums und des Standardserums berechnet und in I.E./ml angegeben.

3.4.1.2. Reagenzien und Geräte

10 %ige Dextransulfat-Lösung.

1 molare CaCl_2 -Lösung.

Antistreptolysin O-Serum (standardisiertes Humanserum):
1 ml enthält 10 I.E. ASL O.

Phosphat-Pufferlösung pH 7,3 (=PBS): hergestellt durch 1:20
Verdünnung des Pufferkonzentrates in Aqua dest.

Streptolysin O-Reagenz.

Natriumthioglycolat-Lösung (0.3 mol/l), als Reduktions-
mittel.

2.0 %ige Hammelerythrozytensuspension: Die Hammelerys wur-
den dazu sorgfältig in PBS gewaschen und anschließend in
PBS aufgeschwemmt.

Negativ-Kontrolle: ASL O-Gehalt 100-175 I.E./ml.

Positiv-Kontrolle: ASL O-Gehalt 600-900 I.E./ml.

3.1.1.3. Versuchsdurchführung

Dextransulfatfällung

Zur Ausschaltung unspezifischer Reaktionen wurden die zu
untersuchenden Seren einer Dextransulfat-Fällung (2)
unterzogen: 0.5 ml inaktiviertes Patientenserum wurde mit
0.1 ml CaCl_2 -Lösung, 0.1 ml Dextransulfatlösung und 0.3 ml
Aqua dest. vermischt, 40 Minuten im Kühlschrank aufbewahrt
und anschließend 10 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert.

Vorverdünnung

Aus den Überständen der "Dextran gefällten" Seren (Verdü-
nung 1:2) wurden mittels PBS Vorverdünnungen von 1:50 und
1:75 hergestellt. Ebenso wurden mittels PBS Vorverdünnungen
des ASL O-Standardserums mit einem ASL O-Gehalt von 1.0
I.E./ml und 1.5 I.E./ml pipettiert. Mit dem negativen und
positiven Kontrollserum wurde wie mit den Patientenseren
verfahren (einschließlich Fällung).

Herstellung der Verdünnungsreihen

Je 0.05 ml der vorverdünnten Proben (Patientenseren, Stan-
dardserum, Positiv- und Negativ-Kontrolle) wurden in Cup 1
der Reihen A-H der Mikrotiterplatten (Rundboden) gegeben.
In Cup 2-12 wurden 0.025 ml PBS vorgelegt und anschließend
durch fortlaufendes Pipettieren von 0.025 ml Probenmaterial
bzw. Probeverdünnung eine geometrische Verdünnungsreihe mit
dem Faktor 2 hergestellt. Die resultierenden Verdünnungs-
stufen sind aus der Tabelle 2 ersichtlich.

Antigen-Antikörper-Reaktion

Jedem Cup der Verdünnungsreihen wurden 0.025 ml der Streptolysin O-Gebrauchslösung (bestehend aus einem Teil Streptolysin O Reagens, zwei Teilen Natriumthioglycolat-Lösung und 9,5 Teilen PBS) zugesetzt. Diese Gebrauchslösung soll nach dem Mischen erst 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren, bevor sie den Antikörperverdünnungen zugesetzt wird.

Nach dem Mischen wurden die Platten mit einer Glasplatte verschlossen und 25 Minuten bei 37 Grad C im Brutschrank inkubiert.

Indikatorreaktion

0.025 ml einer 2.0 %igen Hammelerythrozytensuspension wurden nach der Inkubation in jeden Napf getropft und durch Schütteln der Platten mit dem Napfinhalt gut vermischt. Die Platten wurden dann erneut mit einer Glasplatte verschlossen, um ein Verdunsten der Flüssigkeit zu vermeiden und dann 45 Minuten bei 37 Grad C im Brutschrank inkubiert. Nach 15-minütigem Aufenthalt der Platten bei Raumtemperatur und anschließendem 5-minütigem Zentrifugieren bei 2000 U/min wurde die Reaktion bei Auflicht über einen Vergrößerungsspiegel abgelesen.

		REIHE						
SdSe	I.E.	1.5	0.75	0.375	usw.			A
SdSe	I.E.	1.0	0.5	0.25	usw.			B
PnSe1	Vd 1:	50	100	200	400	800	1600	C
	Vd 1:	75	150	300	600	1200	2400	D
PnSe2	Vd 1:	50	100	200	400	800	1600	E
	Vd 1:	75	150	300	600	1200	2400	F
PnSe3	Vd 1:	50	100	200	400	800	1600	G
	Vd 1:	75	150	300	600	1200	2400	H
Cup		1	2	3	4	5	6	usw.

Tab.2: Pipettierschema des ASL O-Tests

3.4.1.4. Beurteilung

Bei allen Proben wurde jene Verdünnung ermittelt, welche beginnende Hämolyse zeigt. Den ASL O-Gehalt der untersuchten Seren erhielt man durch Multiplikation der ermittelten Patienten-Serumverdünnung mit der ASL O-Konzentration des Standardserums.

In einer früheren Studie (106) wurden für den Münchener Raum als obere Grenze des Normalbereiches für den ASL O-Gehalt Gesunder 300 I.E./ml ermittelt. Ein ASL O-Gehalt von größer oder gleich 400 I.E./ml gilt dabei als signifikant erhöht.

3.4.2. Anti-Hyaluronidase-Bestimmung (AHy-Test)

Die Bestimmung der Anti-Hyaluronidase-Titer im Serum erfolgte nach der Hyaluronsäure-Fällungsmethode, einer Weiterentwicklung des Trübungs-Vermindertestes, mit den Reagenzien der Behringwerke nach Vorschrift. (50, 70, 97)

3.4.2.1. Testprinzip

In einer Antigen-Antikörper-Reaktion reagiert im Serum vorhandene Anti-Hyaluronidase mit zugegebener Hyaluronidase. Anschließend wird Hyaluronsäure zugesetzt. Liegt freie, d.h. nicht durch Antikörper gebundene Hyaluronidase vor, so wird die zugesetzte Hyaluronsäure depolymerisiert; ist dagegen die gesamte Hyaluronidase durch Antikörper blockiert, dann bleibt die Hyaluronsäure nachweisbar. Sie wird durch Zugabe eines kationischen Detergens-Farbstoff-Komplexes (Cethyltrimethylammoniumbromid und Kongorot) als orange-rotes Präzipitat ausgefällt.

Der Antihyaluronidase-Gehalt im Serum wird in Titerwerten angegeben.

3.4.2.2. Reagenzien und Geräte

Lyophilisiertes Hyaluronsäure-Substrat: Lösung mit 0.07 g/l in Aqua dest.

Lyophilisierte Streptokokken-Hyaluronidase : die gebrauchsfertige Lösung enthält 35 bis 50 U/ml.

CTA-Farbstoff-Reagens: die Lösung enthält Cethyltrimethylammonium-bromid (1.2 g/l), den Disazo-Farbstoff Kongorot (0.43 g/l) und den metachromatischen Farbstoff Toluidinblau O (0.039 g/l).

Anti-Streptokokken-Hyaluronidase-Standard-Serum: flüssiges stabilisiertes Human-Serum, das bei vorschriftsmäßigen Testverlauf einen AHyase-Titer von 300 besitzt.

Konservierungsmittel: Natriumazid 1 g/l.

0.15 M NaCl-Lösung als Verdünnungsmittel.

Mikrotitersystem.

3.1.2.3. Versuchsdurchführung

Vorverdünnung der inaktivierten Seren

Die untersuchten Seren wurden zuvor mit der NaCl-Lösung 1:25 bzw. 1:37.5 vorverdünnt, ebenso das Standardserum.

Herstellung der Verdünnungsreihen

0.05 ml der vorverdünnten Proben wurden in Cup 1 der Reihen A-H der Mikrotiter-U-Platten gegeben. In die Cups 2-12 wurden 0.025 ml NaCl-Lösung vorgelegt. 0.025 ml des ersten Cups wurden dann mit Cup 2 vermischt, diesem Gemisch wurden wiederum 0.025 ml entnommen und Cup 3 zugeführt und vermischt usw.. Auf diese Weise entstanden je 2 geometrische Verdünnungsreihen (1:25, 1:50, 1:100 usw und 1:37.5, 1:75, 1:300 usw.). Die Cups G 12 und H 12 wurden für Enzym und Substratkontrollen freigelassen und enthielten zu diesem Zeitpunkt lediglich 0.025 ml bzw. 0.05 ml NaCl-Lösung. Die Cups A 12 bis F 12 wurden mit 0.025 ml Serum-Kontrolle und 0.025 ml NaCl-Lösung versetzt.

Antigen-Antikörper-Reaktion

Jedem Napf, außer den Substrat- und Serumkontrollen wurden 0.025 ml Streptokokken-Hyaluronidase-Lösung zugegeben und mit dem Inhalt vermischt. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde allen Cups 0.025 ml Hyaluronsäure beigemischt. Die Platten wurden anschließend versiegelt und 20 Minuten bei 37 Grad C im Brutschrank inkubiert.

Indikatorreaktion

Danach wurde in jede Vertiefung 0.05 ml CTA Farbstoff-Reagens pipettiert und vermischt. Nach 30-minütigem Aufenthalt der Platten im Brutschrank, wurde die Reaktion über einer beleuchteten Milchglasscheibe abgelesen.

3.4.2.4. Beurteilung

Es wurden diejenigen Verdünnungsstufen bei Standard- und Patientensera festgehalten, bei denen noch eine orange-farbene Präzipitation wahrnehmbar war und daraus die Anti-Streptokokken-Hyaluronidase-Konzentration im Patientenserum berechnet :

$$\text{Titer} = \frac{\text{Verdünnungsfaktor (Patientenserum)}}{\text{Verdünnungsfaktor (Standard-Serum)}} \times 300$$

Für den Münchener Raum gilt als obere Grenze des Normalbereiches ein Titer von 450, als signifikant erhöht sind Titer größer oder gleich 600 zu betrachten (106).

3.4.3. Anti-DNase B-Bestimmung (ADNase B-Test)

Die Bestimmung der Anti-DNase B erfolgte als Toluidinblau O-Test nach Tiesler (88, 89), mit den Reagenzien der Behringwerke nach Vorschrift.

3.4.3.1. Testprinzip

Im Serum vorhandene ADNase B reagiert mit einer standardisierten Menge Streptokokken-DNase B. Zu diesem Testansatz wird DNA-Toluidinblau O-Substrat gegeben. Ist die gesamte DNase B durch Antikörper gebunden, kommt es zu keiner Veränderung im DNA-Toluidinblau O-Substrat-Komplex. Liegt jedoch DNase B frei vor, wird der Substratkomplex gespalten, der Farbstoff fällt flockig aus und die überstehende Lösung entfärbt sich. Der Anti-DNase B-Gehalt der Seren wurde mit Hilfe des Anti-Streptokokken-DNase B-Standard-Serums bestimmt und in Iterwerten angegeben.

3.4.3.2. Reagenzien und Geräte

Lyophilisiertes DNA-Toluidinblau O-Substrat, bestehend aus einer DNA-Lösung (0.5 g/l), die den metachromatischen Farbstoff Toluidinblau O (0.2 g/l) enthält.

Lyophilisierte Streptokokken-DNase B: die gebrauchsfertige Lösung enthält eine Aktivität von ca. 30 U/ml.

Anti-Streptokokken-DNase B-Standard-Serum, ein flüssiges stabilisiertes Humanserum, das bei vorschriftsmäßiger Testdurchführung einen ADNase B-Titer von 300 besitzt; enthält Natriumazid (1 g/l) als Konservierungsmittel.

Imidazol-Pufferlösung pH 7.8, enthält Imidazol (17 g/l), Rinderserumalbumin (2 g/l), $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ (1.47 g/l) und $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ (0.6 g/l).

Mikrotitersystem.

3.4.3.3. Versuchsdurchführung

Vorverdünnung

Die inaktivierten Patientenserum und das Standardserum wurden mit Imidazol-Pufferlösung 1:25 und 1:37.5 vorverdünnt.

Herstellung der Verdünnungsreihen

0.05 ml der vorverdünnten Proben wurden in Cup 1 der Reihen A-H der Mikrotiter-U-Platten pipettiert. In Cup 2-11 wurden 0.025 ml Imidazol-Pufferlösung vorgelegt und wie in 3.4.2.3. eine geometrische Verdünnungsreihe mit dem Faktor 2 hergestellt. Cup 12 A-H wurden mit Enzym-, Substrat- und Serumkontrollen versehen.

Antigen-Antikörper-Reaktion

Jeder Vertiefung wurden 0.025 ml der gebrauchsfertigen Streptokokken-DNase B-Lösung zugegeben, lediglich die Substrat- und Patientenserum-Kontrollen erhielten anstelle der Enzym-Lösung 0.025 ml Puffer. Nach einminütigem Mischen wurden die verschlossenen Platten 15 Minuten bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Indikatorreaktion

Nach Zugabe von 0.05 ml DNA-Toluidinblau O-Substrat in alle Cups und anschließendem Mischen, wurden die Platten verschlossen in einer feuchten Kammer 4 Stunden im Brutschrank bei 37 Grad C inkubiert.

Nach erneuten Mischen und 5-minütigen Zentrifugieren der Platten bei 2000 U/min erfolgte das Ablesen der Reaktion auf einer beleuchteten Milchglasscheibe.

3.1.3.4. Beurteilung

Es wurden Standard- und Patientensera-Verdünnungsstufen notiert, bei denen eine blaue Präzipitation noch nicht wahrnehmbar war und daraus der ADNase B-Titer im Patientensera bestimmt:

$$\text{Titer} = \frac{\text{Vdfaktor(PnSe)}}{\text{Vdfaktor(SdSe)}} \times \text{ADNase B-Konz. (SdSe)}$$

Für den Münchener Raum gilt als obere Grenze des Normalbereiches ein Titer von 300, als signifikant erhöht gelten Titer größer oder gleich 400. (106)

3.1.4. Anti-Streptokinase-Bestimmung (ASk-Test)

Die ASk-Bestimmung erfolgte nach einer Modifikation von Wilske und Schiers der Methode von Bössörmenyi (13) mit den Reagenzien der Behringwerke.

3.1.4.1. Testprinzip

Im Serum vorhandene Anti-Streptokinase reagiert mit einer standardisierten Menge zugesetzter Streptokinase. Diesen in Fibrinogenlösung verdünnten Testansatz wird eine Plasminogen-Thrombinlösung beigemischt. Wurde die gesamte Streptokinase durch Antikörper gebunden, so bildet sich ein Fibrinnetz, das einen zugetropften Coomassie-blue-Tropfen auffängt.

Liegt jedoch Streptokinase in ausreichender Konzentration frei vor, unterbleibt die Fibrinnetsbildung und der zugesetzte Farbstoff verteilt sich gleichmäßig im Reaktionsgemisch. Der ASk-Gehalt wurde mit Hilfe eines Beriglobin-Standards berechnet und in E/ml angegeben.

3.4.4.2. Reagenzien und Geräte

Test-Fibrinogen vom Rind: als Gebrauchslösung 1, in einer Konzentration von 2 g/l gepufferter steriler NaCl-Lösung pH 7.4; als Gebrauchslösung 2, in einer Konzentration von 2.5 g/l gepufferter steriler NaCl-Lösung.

Lyophilisiertes humanes Test-Plasminogen: die gebrauchsfertige Lösung enthält 20 CTA/ml.

Lyophilisiertes bovines Test-Thrombin: die gebrauchsfertige Lösung enthält 30 IU/ml = 60 NIH/ml.

Plasminogen-Thrombinlösung: 1.375 ml einer 1:30 in PBS verdünnten Thrombinlösung wurden dazu mit 0.22 ml Plasminogenlösung und 3.85 ml PBS vermischt.

Beriglobin: Immungehalt 160 g/l, 1 mg entspricht 10 Sk-Einheiten.

0.15 %iges Coomassieblue G-250 in wässriger Lösung.

Lyophilisierte Test-Streptokinase: gelöst in PBS enthält 1 ml 2000 I.E.; die Streptokinase-Testverdünnung muß für jedes neue Fläschchen ausstitriert werden, in 2 Verdünnungsstufen, ausgehend von den Grundverdünnungen 1:500 und 1:750. Für den Test wurde die 4-fache Menge des erreichten Titors verwendet. (Der optimale Sk-Gehalt sollte innerhalb der 2- bis 8-fachen Menge der minimalsten effektiven Dosis liegen).

Immunolonplatten mit Flachboden; sterile Eppendorfspitzen und -tropfer;

Mehrkanalpipette; Eisbad; PBS.

3.4.4.3. Versuchsdurchführung

Streptokinaseverdünnung

Das Ergebnis der zuvor ermittelten Sk-Titration, auf Grund derer eine Sk-Testverdünnung von 1:500 gewählt wurde, ist auf jeder Mikrotiterplatte überprüft worden. Dazu wurden zunächst in Cup 1 und 2 der Reihe A 0.1 ml 1:500 bzw. 1:750 vorverdünnter Sk-Lösung gegeben, in Cup 3-12 0.05 ml PBS vorgelegt und durch überspringendes Pipettieren 2 geometrische Verdünnungsreihen hergestellt (1:500, 750, 1000, 1500, 2000, usw.).

Beriglobintitration

In Cup 1 der Reihen B und C wurden je 0.1 ml der 1:10 bzw. 1:15 vorverdünnten (in der Fibrinogen-Gebrauchslösung 2) Beriglobinlösung vorgelegt, in die Cups 2-12 je 0.05 ml Fibrinogen-Gbrchslg 1.

Anschließend wurde durch fortlaufendes Pipettieren von 0.05 ml Beriglobinlösung/-verdünnung eine geometrische Verdünnungsreihe mit dem Faktor 2 hergestellt (s.Tab. 3).

Serumverdünnungen

Im Cup 1 der Reihen D-H wurden 0.02 ml inaktiviertes Patientenserum mit 0.08 ml Fibrinogen-Gbrchslg 2 vermischt, Cup 2-12 mit 0.05 ml Fibrinogen-Gbrchslg 1 gefüllt. Durch Überpipettieren von 0.05 ml Probenverdünnung wurde eine geometrische Verdünnungsreihe hergestellt (1:5, 1:10 usw.). Während der Herstellung der Verdünnungsreihen und der Zugabe der Reagenzien wurden die Mikrotiterplatten und sämtliche Reagenzien im Eisbad aufbewahrt.

Antigen-Antikörper-Reaktion

Alle Reihen bis auf die Reihe A der Test-Streptokinase wurden mit 0.05 ml Sk-Testverdünnung vermischt, die Platten feucht abgedeckt und anschließend für 30 Minuten im Brutschrank inkubiert. Dann wurde allen Cups 0.05 ml Plasminogen-Thrombinlösung beigemischt und die Platten wiederum feucht abgedeckt für 30 Minuten im Brutschrank (37 Grad C) inkubiert.

Indikatorreaktion

Nach 10-minütigen Verweilen der Platten im Eisbad, wurde ein Tropfen Coomassieblau zugesetzt und notiert, in welchen Cups eine Fibrinnetzbildung auftrat bzw. verhindert wurde.

2.4.4.4. Beurteilung

Als Streptokinase-Titer gilt der letzte Cup mit verhinderter Netzbildung. Der Sk-Gehalt der Patientensera wurde mit Hilfe des Beriglobin-Titers berechnet. Der Beriglobin-Titer entspricht dem Reziprokvart der Verdünnung des letzten Cups mit beginnender oder vollständiger Netzbildung und entspricht 1600 E/ml. Für den Münchener Raum gilt ein ASK-Gehalt größer oder gleich 200 E/ml als signifikant erhöht.

		REIHE							
Sk	Vd 1:	500	750	1000	1500	2000	3000	usw.	A
Bgl	Vd 1:	10	20	40	80	160	320	usw.	B
Bgl	Vd 1:	15	30	60	120	240	480	usw.	C
PnSe1	Vd 1:	5	10	20	40	80	160	usw.	D
PnSe2	Vd 1:	5	10	20	40	80	160	usw.	E
PnSe3	Vd 1:	5	10	20	40	80	160	usw.	F
PnSe4	Vd 1:	5	10	20	40	80	160	usw.	G
PnSe5	Vd 1:	5	10	20	40	80	160	usw.	H
Cup		1	2	3	4	5	6	usw.	

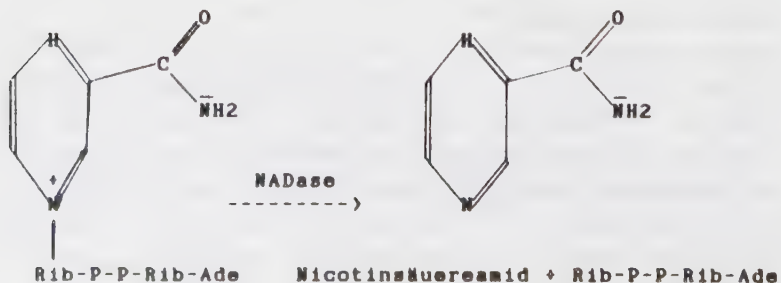
Tab. 3: Titrationsschema des Anti-Streptokinase-Tests

3.4.5. Die Anti-NADase-Bestimmung als Fluoreszenztest (ANADase-FT)

In dieser Studie wurde die ANADase-Bestimmung als Fluoreszenztest mit den Reagenzien der Behringwerke nach den von Tiesler angegebenen Vorschriften als Mikrottest durchgeführt. (92)

3.4.5.1. Testprinzip

Nicotin-adenin-dinucleotid (NAD⁺) wird durch Einwirkung von Streptokokken-NADase in Nicotinsäureamid und Adenosindiphosphatribose gespalten. (45)



Diese enzymatische Reaktion wird durch spezifische Antikörper im Serum, nämlich ANADase gehemmt. Diese Voraussetzungen ermöglichen es, ANADase im Serum nachzuweisen. Dazu wird das zu untersuchende Serum mit einer definierten Menge NADase inkubiert. Vorhandene ANADase bindet die freie NADase und hemmt dadurch ihre enzymatische Wirkung. Zu diesem Testansatz zugegebenes NAD^+ bleibt unverändert und steht für weitere Reaktionen zur Verfügung. Eine solche Reaktion ist die Umwandlung von NAD^+ in $\text{NADH} + \text{H}^+$ unter Mitwirkung von Alkohol und Alkoholdehydrogenase (ADH) in einer gekoppelten Reaktion. Durch ADH wird Alkohol zu Acetaldehyd oxidiert, NAD^+ dagegen zu $\text{NADH} + \text{H}^+$ reduziert. NADH zeigt nun im Gegensatz zu NAD^+ bei 340 nm eine deutliche Fluoreszenz, die sich mit einer UV-Lampe sichtbar machen läßt. Der NADase-Gehalt eines Serums wird in E/ml angegeben.

3.4.5.2. Reagenzien und Geräte

Lyophilisierte Streptokokken-NADase: die gebrauchsfertige Lösung enthält 500 E/ml.

Nicotin-adenin-dinucleotid (NAD^+): die gebrauchsfertige Lösung wird wie die NADase bis zur Verwendung im Eisbad aufbewahrt.

Lyophilisierte Alkoholdehydrogenase (ADH): wird in 0.5 ml Aqua bidest. gelöst und im Kühlschrank aufbewahrt.

Unmittelbar vor der Verwendung wird diese ADH-Suspension in Pufferlösung II im Verhältnis 1:20 verdünnt.

Pufferlösung I: pH 7.3, entspricht einem Sörensen-Puffer und enthält Natriumazid (1 g/l) als Konservierungsmittel (Phosphat-Puffer 0.1 M).

Pufferlösung II: pH 9.0, enthält $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$ (0.2 mol/l), Semicarbazidhydrochlorid (1 g/l) und als Konservierungsmittel Natriumazid (1 g/l).

BSA-Pufferlösung: 1-%ig, hierzu wird eine 30 %ige Rinderserumalbuminlösung im Verhältnis 1:30 mit Pufferlösung I verdünnt.

ANADase-Standard-Serum vom Kaninchen mit 400 E/ml: Dieses Referenzserum entspricht den Angaben von Kellner et al (45), wonach 1 E ANADase 100 E NADase neutralisiert.

Negatives Kontrollserum.

Polystryrol-Flachboden-Mikrotiterplatten (Immunolon, Flow Laborat.); Mikrotitersystem; Eisbad; Stoppuhr.

Wasserbäder: 37 Grad C mit Umwälzthermostat, 56 Grad C und 65 Grad C.

Analysenlampe Fluotest-Forte (Quarzlampen, Hanau).

3.4.5.3. Versuchsdurchführung

Herstellung der Verdünnungsreihen

In Cup 1 wurden 0.09 ml, in Cup 2-11 0.05 ml BSA-Pufferlösung vorgelegt. Cup 12 A-F blieb frei, Cup 12 G und H dienten zur Aufnahme der Enzym- und Substratkontrolle. Mit Cup 1 wurden in Reihen A 0.01 ml ANADase-Standard-Serum, in Reihe B 0.01 ml negatives Kontrollserum und in den Reihen C-H 0.01 ml Patientenserum vermischt. Durch Überpipettieren und Mischen von 0.05 ml Probeverdünnung wurden geometrische Verdünnungsreihen mit den Stufen 1:10 bis 1:10240 hergestellt.

Antigen-Antikörper-Reaktion

Jedem Cup, bis auf die Enzym- und Substratkontrolle wurden 0.025 ml BSA-Pufferlösung beigemischt. Die Enzymkontrolle erhielt insgesamt 0.075 ml BSA-Pufferlösung, die Substratkontrolle insgesamt 0.1 ml. Anschließend erhielten alle Cups, bis auf die Substratkontrolle 0.025 ml NADase. Zum Ablauf der NADase-ANADase-Reaktion wurden die mit feuchtem Papier und einer Glasplatte verschlossenen Mikrotiterplatten für 30 Minuten bei 37 Grad C im Brutschrank inkubiert.

Enzymreaktion

Anschließend wurde den ins Eisbad gestellten Platten 0.025 ml eisgekühltes NAD+ zugetropft. Die Platten wurden dann genau 7.5 Minuten im Wasserbad bei 37 Grad C inkubiert. Durch einen Umwälzthermostaten wurde die Temperatur in allen Wasserschichten gleichmäßig gehalten. Freie NADase konnte nun NAD+ spalten.

Exakt nach 7.5 Minuten wurde die Enzymreaktion gestoppt, indem man die Platten für 3 Minuten in ein Wasserbad von 65 Grad C gab. Im Eisbad wurden die Platten gekühlt und dann auf Zimmertemperatur erwärmt.

Indikator-Reaktion

Nach Zugabe von 0.05 ml ADH-Pufferlösung II blieben die Platten noch 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen und wurden dann 15 Minuten im Kühlschrank aufbewahrt. Nicht gespaltenes NAD⁺ wurde während dieser Zeit zu fluoreszierendem NADH⁺ reduziert. Unter der Analysenlampe konnte das Ergebnis im Anschluß daran abgelesen werden.

3.4.5.4. Beurteilung

Aus den ermittelten Titerwerten für die Patientenserum und für das Standard-Serum wurde der ANADase-Gehalt der Patientenserum in E/ml berechnet:

$$\text{ANADase-Gehalt} = \frac{\text{Titer (Patientenserum)}}{\text{Titer (Standard-Serum)}} \times 400 \text{ E/ml}$$

Für den Münchener Raum gilt als obere Grenze des Normalbereiches ein ANADase-Gehalt von 50 E/ml; als signifikant erhöht gilt ein Gehalt größer oder gleich 75 E/ml. (106)

3.5. Bestimmung der enzymatischen Aktivität der Exoenzymkonzentrate

Getestet wurden die 25-fach eingegangten Sterilfiltrate der Überstände des jeweiligen Stammes. Außerdem wurde in jedem Test eine Exoenzympräparation des Stammes H 46 A der Behring-Werke mitgeführt.

3.5.1. Bestimmung der Streptolysin O-Aktivität

Die Bestimmung der SL O-Aktivität erfolgte in einer Modifikation der Methode von Smyth und Arbuthnott (82) mit den Reagenzien der Behringwerke und Cysteinhydrochlorid als Reduktionsmittel. Der Test, dessen Prinzip schon von Todd (96) beschrieben wurde, verwendete das Verdünnungsschema von Tiesler und Trinks (93).

3.5.1.1. Testprinzip

SL O bewirkt im reduzierten Zustand in einer definierten Hammelerythrozytensuspension eine Hämolyse. Die Hämolyse wird dann mit Hilfe von Hämolysestandards bewertet. Der SL O-Gehalt des Exoenzymkonzentrates wird anschließend mit Hilfe eines standardisierten SL O-Reagens berechnet und in E/ml angegeben.

Eine hämolytische Einheit ist die kleinste Lysinmenge, die nötig ist, eine 50 %ige Lyse einer 0.7 %igen Erythrozytensuspension zu bewirken, nach 30-minütiger Inkubation bei 37 Grad Celsius. (17, 80)

3.5.1.2. Reagenzien und Geräte

Phosphat-Pufferlösung pH 7.3 (PBS): hergestellt durch 1:20 Verdünnung des Pufferkonzentrates in Aqua bidest..

Streptolysin O-Reagens (SL O): enthält nach Vorschrift in 5 ml PBS gelöst 9.4 E/ml.

1 %ige Hammelerythrozytensuspension: Hierzu wurden mehrfach in PBS gewaschene Hammelblutkörperchen mit PBS vermischt, bei 3000 U/min zentrifugiert und das Sediment 1:5 in PBS vermischt (20 %ige Hammelerythrozytensuspension). Diese Suspension wurde anschließend 1:20 in PBS verdünnt.

100 %ige Hämolyselösung: Hierzu wurden vermischt: 1 ml 20 %ige Hammelerythrozytensuspension, 9.0 ml Aqua dest., 9.0 ml 0.3 M NaCl-Lösung und 1.0 ml 0.15 M NaCl-Lösung.

0.1 M neutrale Cysteinhydrochloridlösung: Kurz vor dem Gebrauch der Lösung wurden hierzu 0.1756 g L-Cystein-chlorid 46 in Aqua dest. gelöst und mittels 1 N NaOH im PH-Meter auf pH 7.0 eingestellt.

ASL O-haltiges Kaninchenserum mit definiertem Antikörpertiter.

Kontrollensym H 46 A: 1 mg/ml PBS.

Mikrotitersystem; Multikanalpipette.

Polystyrol-U-Boden-Mikrotiterplatten (Immunolon, Flow Laboratories).

3.5.1.3. Versuchsdurchführung

Herstellung der Hämolysestandards

Durch Mischen von 1 %iger Hammelerythrozytensuspension (0 %ige Hämolyse) und 100 %iger Hämolyselösung wurden Hämolysestandards hergestellt (0-100 %ige Hämolyse in 10 % Schritten), die bei jeder Mikrotiterplatte (in Reihe H) mitgeführt wurden.

Reduktion der Enzympräparate

Hierzu wurden 0.1 ml Testmaterial (SL O-Standard-Reagens, H 46 A und Exoenzymkonzentrate) mit 0.025 ml 0.1 M neutraler Cysteinhydrochloridlösung vermischt, 15 Minuten bei 37 Grad C im Brutschrank inkubiert und anschließend 0.075 ml PBS zugesetzt (= Vorverdünnung 1:2)

Herstellung der Verdünnungsreihen

In Cup 1 der Reihe A-G wurde 0.05 ml reduziertes Testmaterial eingefüllt, die Nüpfen 2-12 erhielten 0.025 ml PBS. Durch Überpipettieren von 0.025 ml Testmaterial/-verdünnung wurden geometrische Verdünnungsreihen in den Stufen 1:2 bis 1:4096 hergestellt.

Enzymreaktion

Alle Nüpfen bis auf die Hämolysestandards erhielten je 0.05 ml 1 %ige Hammelerythrozytensuspension. Die Platten wurden mit Folie versiegelt und 45 Minuten im Wasserbad bei 37 Grad C inkubiert und dann 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach kurzem Zentrifugieren der Platten bei 1000 U/min wurden die Folie abgezogen und die Reaktion über einen Vergrößerungsspiegel bei Auflicht abgelesen.

3.5.1.4. Beurteilung

Für den SL O-Nachweis wurde eine 50 %ige Hämolyse zugrundegelegt. Der SL O-Gehalt der Exoenzympräparate wurde mit Hilfe des SL O-Standard-Reagens berechnet:

$$\text{SL O-Gehalt} = \frac{\text{Titer (Enzymkonzentrat)}}{\text{Titer (Standard)}} \times 9,4 \text{ E/ml}$$

Die Spezifität des SL O-Nachweises wurde durch einen Hemmversuch mit ASL O-haltigen Kaninchenserum sichergestellt.

3.5.2. Bestimmung der Hyaluronidase-Aktivität

Die Bestimmung der Hyaluronidase-Aktivität wurde in einer Modifikation der Methode von Knöll (50) mit dem Reagenssatz der Behringwerke durchgeführt.

3.5.2.1. Testprinzip

In Exoenzympräparat vorhandene Hyaluronidase spaltet zugesetzte Hyaluronsäure, welche dann nach Zugabe eines kationischen Detergens-Farbstoffkomplexes (Cethyltrimethylammoniumbromid -kurz CTA- und Kongorot) nicht mehr nachweisbar ist. Die Lösung bleibt homogen. Ist allerdings keine oder zu geringe Hyaluronidase-Aktivität vorhanden läßt sich die zugegebene Hyaluronsäure als orangefarbenes Präzipitat mittels CTA-Farbstoff-Reagens ausfällen. Der Hyaluronidase-Gehalt wird in E/ml angegeben und über den Streptokokken-Hyaluronidase-Standard berechnet.

3.5.2.2. Reagenzien und Geräte

Streptokokken-Hyaluronidase-Standard: die gebrauchsfertige Lösung enthält 70 E/ml.

Streptokokken-Hyaluronsäure-Substrat, lyophilisiert: die gebrauchsfertige Lösung enthält 0.07 g/l Aqua bidest..

CTA-Farbstoff-Reagens: die Lösung enthält Cethyl-trimethylammonium-bromid (1.2 g/l), den Disazo-Farbstoff Kongorot (0.43 g/l) und den metachromatischen Farbstoff Toluidinblau O (0.039 g/l).

Kontroll-Enzym H 46 A, lyophilisiert: wird unmittelbar vor Gebrauch in 0.15 M NaCl-Lösung aufgelöst zu einer Konzentration von 10 g/l.

0.15 M NaCl-Lösung als Puffer.

Polystyrol-U-Boden Mikrotiterplatten (Immunolon, Flow Laboratories).

Mikrotitersystem, Multikanalpipette.

3.5.2.3. Versuchsdurchführung

Herstellung der Verdünnungsreihen

In Napf 1 der Reihen A-H wurden je 0.1 ml Testmaterial (Hyase-Standard, H 46 A, Exoenzymkonzentrate) eingefüllt, in Napf 2-12 je 0.05 ml NaCl-Lösung vorgelegt und durch fortlaufendes Überpipettieren von 0.05 ml Testmaterial bzw. -verdünnung Verdünnungsreihen von 1:1 bis 1:2048 hergestellt. Auf eine Vorverdünnung der Exoenzymkonzentrate (1:10) wurde wegen der zu erwartenden geringen Hyase-Aktivität (103) verzichtet. Cup 12 der Reihe A wurde für die Substratkontrolle freigehalten.

Enzymreaktion

Alle Nüpfе erhielten 0.05 ml Streptokokken-Hyaluronsäure-Substrat. Die mit einer Folie versiegelten Platten wurden 20 Minuten im Wasserbad bei 37 Grad C inkubiert.

Indikatorreaktion

Nach Abziehen der Folie wurden 0.05 ml CTA-Farbatoffreagenz beigemischt und die Platten offen 30 Minuten bei 37 Grad C im Brutschrank inkubiert. Nach 3-minütigen Zentrifugieren bei 1000 U/min wurde die Reaktion über einem Vergrößerungsspiegel abgelesen.

3.5.2.4. Beurteilung

Als Titer galt derjenige Verdünnungsfaktor, bei dem noch keine Präzipitation erfolgte. Der Hyase-Gehalt des Exoenzym-Konzentrates wurde aus dem Titer des Enzymkonzentrates und der Hyase-Konzentration im Standard berechnet:

$$\text{Hyase-Gehalt} = \frac{\text{Titer (Enzymkonzentrat)}}{\text{Titer (Standard)}} \times 70 \text{ E/ml}$$

3.5.3. Bestimmung der DNase B-Aktivität

Zur Anwendung kam eine Modifikation des Toluidinblau O-Verfahrens nach Tiesler (89) unter Benützung des Reagenssatzes der Behringwerke.

3.5.3.1. Testprinzip

Im Enzympräparat vorhandene DNase B spaltet den zugefügten DNA-Toluidinblau O-Substratkomplex, wobei Toluidinblau O ausfällt und die überstehende Lösung sich entfärbt. Ist die DNase B-Aktivität jedoch zu gering oder fehlend, bleibt die Lösung homogen blau. Der DNase B-Gehalt wird über den Standard berechnet und in E/ml angegeben.

3.5.3.2. Reagenzien und Geräte

Imidazol-Pufferlösung pH 7.8: enthält Imidazol (17 g/l), Rinderalbumin (2 g/l), $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ (1.47 g/l) und $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ (0.6 g/l).

DNA-Toluidinblau O-Substrat, lyophilisiert: besteht aus einer DNS-Lösung (0.5 g/l), die den metachromatischen Farbstoff Toluidinblau O (0.2 g/l) enthält.

Streptokokken-DNase B-Standard, lyophilisiert: die gebrauchsfertige Lösung enthält eine Aktivität von 30 U/ml.

Kontroll-Enzym H 46 A, lyophilisiert: wird unmittelbar vor Gebrauch in Imidazol-Pufferlösung aufgelöst zu einer Konzentration von 10 g/l.

Polystyrol-U-Boden-Mikrotiterplatten (Immunolon, Flow Laboratories).

Mikrotiterasystem; Multikanalpipette.

3.5.3.3. Versuchsdurchführung

Herstellung der Verdünnungsreihen

Maß 1 der Reihen A-H erhielt je 0.05 ml Enzymmaterial (DNase B-Standard, H 46 A oder Exoenzymkonzentrat). Dann wurden in alle Cups 0.05 ml Imidazol-Pufferlösung eingefüllt und mit der Multikanalpipette Verdünnungsreihen (1:2 bis 1:4096) hergestellt. Cup A 12 erhielt lediglich 0.05 ml Pufferlösung und 0.05 ml DNA-Toluidinblau-Lösung als Substratkontrolle.

Enzymreaktion

Allen Cups, bis auf die schon beschichtete Substratkontrolle wurden 0.05 ml DNA-Toluidinblau O-Substrat beige-mischt.

Die Platten wurden anschließend -verschlossen in einer feuchten Kammer- 4 Stunden im Brutschrank bei 37 Grad C inkubiert. Nach erneutem Mischen wurden die Platten 3 Minuten bei 2000 U/min zentrifugiert und die Reaktion über einer beleuchteten Milchglasscheibe abgelesen.

3.5.3.4. Beurteilung

Es wurden diejenigen Verdünnungsstufen festgehalten, bei denen eine eindeutige Präzipitation noch wahrnehmbar war und vergleichend zum Standard die DNase B-Aktivität in E/ml errechnet:

$$\text{DNase B-Aktivität} = \frac{\text{Titer (Enzymkonzentrat)}}{\text{Titer (Standard)}} \times 30 \text{ E/ml}$$

3.5.4. Bestimmung der Streptokinase-Aktivität

Die Ermittlung der Sk-Aktivität erfolgte nach einer Modifikation von Wilske und Schierz der Methode von Böszörményi (13) mit den Reagenzien der Behringwerke.

3.5.4.1. Testprinzip

Streptokinase überführt Plasminogen menschlichen Serums in Plasmin, ein aktives proteolytische Enzym, das Fibrin verdaut. Das Fibrinnetz, das sich bei Anwesenheit von Thrombin aus Fibrinogen aufbaut und einen zugetropften Coomassieblue-Tropfen auffängt, wird bei ausreichender Aktivität von Streptokinase in einer Plasminogen-Lösung zerstört, so daß sich die zugesetzte Farbatofflösung gleichmäßig im Reaktionsgemisch verteilt.

Die Streptokinase-Aktivität wurde über den Titer der Standard-Streptokinase errechnet und in I.E./ml angegeben.

3.5.4.2. Reagenzien und Geräte

Lyophilisiertes, humanes Test-Plasminogen: gelöst in 1 ml sterilem Aqua dest. enthält die Lösung 20 CTA/ml; für den Test wurde diese Lösung 1:25 in steriler gepufferter NaCl-Lösung pH 7.4 verdünnt.

Test-Fibrinogen vom Rind, lyophilisiert: die gebrauchsfertige Lösung enthält 2 g Fibrinogen/l steriler PBS.

lyophilisiertes bovines Test-Thrombin: gelöst in 1 ml sterilem Aqua dest. enthält ein Fläschchen 30 IU/ml. Dies entspricht 60 NIH/ml. Für den Test wurde diese Lösung 1:120 in steriler PBS verdünnt, was eine Konzentration von 0.5 NIH/ml ergibt.

lyophilisierter Test-Streptokinase-Standard: gelöst in sterilem PBS enthält 1 ml 2000 I.E.. Für den Test wurden Vorverdünnungen von 1:20 und 1:200 in Plasminogengebrauchslösung hergestellt.

0.15 %iges Coomassieblue G 250 in wässriger Lösung.

Kontroll-Enzym H 46 A, lyophilisiert: wird in einer Konzentration von 1 g/l in PBS gelöst. Beim Test wurden 1:10 und 1:100 Vorverdünnungen (in Plasminogengebrauchslösung) verwendet.

Polystyrol-Flachboden-Mikrotiterplatten (Immunolon, Flow Laboratories); sterile Eppendorfspitzen und -tropfer. Multikanalpipette; Eisbad; PBS.

3.5.4.3. Versuchsdurchführung

Alle Reagenzien und Proben wurden im Eisbad aufbewahrt und die Platten im Eisbad beschichtet.

Herstellung der Verdünnungsreihen

Cup 1 der Reihen A-H wurde mit 0.1 ml Enzymmaterial (Vorverdünnungen des Streptokinase-Standards bzw. von H 46 A und 1:2 Verdünnung der Exoenzymkonzentrate in Plasminogengebrauchslösung) versehen.

Cup 2-12 erhielt 0.05 Plasminogen-Lösung (bis auf die Cups 12 A-C, die für die Kontrollen vorgesehen waren).

Mit der Multikanalpipette wurden geometrische Verdünnungsreihen mit dem Faktor 2 erstellt (für die Exoenzympräparate in Verdünnungsstufen von 1:2 bis 1:4096).

Kontrolle 1 erhielt 0.05 ml PBS und 0.05 ml Streptokinase, Kontrolle 2 0.05 ml PBS und 0.05 ml Plasminogenlösung und Kontrolle 3 nur 0.1 ml PBS.

Enzymreaktion

Jedem Napf (auch den Kontrollen 1-3) wurden je 0.05 ml Fibrinogen- und Thrombingebrauchslösung beigemischt und die Platten anschließend 45 Minuten bei 37 Grad C im Brutschrank inkubiert.

Indikatorreaktion

Nach 10-minütigen Verweilen im Eisbad wurden die Platten 10 Sekunden geschüttelt und anschließend jedem Napf ein Tropfen Coomassieblue zugeführt und notiert in welchem Napf eine Fibrinnetzbildung auftrat bzw. verhindert wurde.

3.5.4.4. Beurteilung

Als Titer galt der Reziprokwert der Verdünnung des letzten Cups mit vollständiger Fibrinlysis. Die Streptokinase-Aktivität der Exoenzymkonzentrate wurde über den Titer der Standardpräparation errechnet:

$$\text{Sk-Aktivität} = \frac{\text{Titer (Enzymkonzentrat)}}{\text{Titer (Standard)}} \times 2000 \text{ I.E./ml}$$

ERGEBNISSE UND DISCUSSION

In den Tabellen 4 a und b sind alle ermittelten Werte tabellarisch aufgeführt:

Punkte kennzeichnen fehlende Parameter.

Ließen sich keine Antikörpertiter bzw. Enzymmengen nachweisen, so ist dies mit einer "0" vermerkt.

Eine Erklärung der Abkürzungen befindet sich im Abkürzungsverzeichnis. Die Sk-Werte sind mit dem Faktor 10 multipliziert, um Kommaschreibweisen zu vermeiden.

Die Analyseergebnisse werden dadurch nicht beeinflusst.

Erläuterung der klinischen Parameter

Kein (-Begleitkeim): Hier ist festgehalten, ob in dem vom Patienten entnommenen Abstrich *Staphylococcus aureus* nachweisbar war ("1") oder nicht ("0").

Ausdehn (-Ausdehnung): Beschränkte sich die Pyodermie auf ein kleines Hautareal, ist dies mit einer "0" bewertet. Waren die Effloreszenzen von mittlerer bis großer Ausdehnung, ist dies mit "1" gekennzeichnet.

Komplik (Komplikationsgrad): Im Falle "1" hatten die Streptokokken unmittelbaren Kontakt zu tieferliegenden Gefäßen (z.B. bei superinfizierten Ulcera), bei "0" betraf der Infekt nur die Epidermis.

Best (Bestandsdauer): Sie gibt die Zeit seit dem Bestehen der Effloreszenz in Wochen an. "15" kennzeichnet länger bestehende Infektionen. Wiederholte Rezidive oder chronische Infekte sind mit "52" aufgeführt.

Bestg. (Bestandsdauer-Gruppe): "1" bedeutet eine Bestandsdauer der Infektion größer als 2 Wochen, "0" kleiner oder gleich 2 Wochen.

Atopie: Lag eine atopische Diathese vor, so steht hier "1", wenn nicht dann eine "0".

Alterg (Altersgruppe): Patienten jünger als 18 und älter als 50 wurden zur Altersgruppe "0", Patienten zwischen 18 und 50 Jahren zur Altersgruppe "1" zusammengefaßt.

Sex (Geschlecht): "0" = weibliche Patienten
"1" = männliche Patienten

Alters- und Geschlechterverteilung

Die Altersverteilung wies zwischen den untersuchten 24 Frauen und 39 Männern keine signifikanten Unterschiede auf (p-Wert größer 0.56). Das Durchschnittsalter betrug bei den Frauen 35, bei den Männern 38 Jahre.

Statistische Analyse

Zur Durchführung der statistischen Auswertung wurden von allen ermittelten Antikörper- und Exoenzymwerten der dekadische Logarithmus gebildet, mit Ausnahme der mit "0" gekennzeichneten Werte. Ihr lg wurde gleich 0 gesetzt. Zum Vergleich der Mittelwerte nach verschiedenen klinischen Aspekten wurde der t-Test durchgeführt.

Zur Korrelationsanalyse wurde der Pearsonsche Produkt-Moment-Korrelationskoeffizient errechnet.

Für beide Problemstellungen wurde ein Signifikanzniveau von 95 %, d.h. eine Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner 5 % zugrundegelegt. (p-Wert < 0.05)

NR	ASL	O	AHvase	ADvaseB	ASk	ANADvase	SLO	Hvase	DNvaseB	Sk
1	150		900	9600	200	120	19	18	60	800
2	150		113	400	100	60	0	0	960	800
3	75		113	2400	400	8	38	0	920	400
4	150		150	300	400	60	0	0	920	400
5	150		300	600	533	60	0	0	960	800
6	100		600	3200	533	480	19	9	960	1600
7	300		50		100	120	0	9	960	200
8	100		38		100	240	38	9	480	0
9	50		100	3200	400	240	9	9	960	50
10	150		300	600	100	120	19	9	960	200
11	200		300	1600	1600	480	9	18	240	0
12	100		600	600	800	120	75	18	960	100
13	200		300	150	800	120	19	18	480	100
14	50		300	200	400	0	9	18	1920	50
15	200		3200	400	200	30	19	0	960	0
16	150		3600	450	200	240	38	18	120	13
17	600		150	300	0	240	49	18	480	50
18	75		600	300	25	120	38	70	240	800
19	50		225	450	0	120	38	0	960	6
20	150		1800	450	1600	240	9	18	920	0
21	150		600	900	0	120	5	0	920	0
22	600		4800	4800	0	480	19	18	920	0
23	50		1200	600	0	240	9	18	1920	0
24	400		3600	1800	3200	1920	19	0	30	0
25	50		1200	600	0	50	19	0	960	16
26	200		3600	300	200	25	5	0	480	250
27	1200		9600	900	400	100	19	0	480	0
28	400		600	600	533	120	38	0	480	0
29	112		112	1200	270	.	9	18	120	0
30	150		112	800	135	.	9	35	240	0
31	150		112	300	135	.	9	0	30	400
32	400		400	4800	270	.	38	0	480	200
33	450		0	112	0	.	19	0	480	200
34	600		800	1200	270	.	9	0	480	400
35	200		1200	3600	0	.	19	0	30	200
36	100		7200	1200	540	.	9	0	480	125
37	400		150	112	0	.	5	0	480	500
38	100		1200	600	270	.	9	0	480	63
39	600		2400	19200	2160	.	38	0	960	0
40	900		112	19200	0	.	19	0	480	0
41	3600		9600	12800	4320	.	19	0	960	0
42	300		4800	4800	0	.	38	0	15	0
43	600		1200	1600	135	.	19	9	960	50
44	400		1800	6400	0	.	19	70	0	400
45	150		1800	6400	540	.	38	0	960	400
46	40		600	200	0	.	5	0	480	50
47	240		1800	600	270	.	19	70	240	1600
48	900		225	150	17280	.	9	0	0	1600
49	150		2400	4800	540	.	19	0	0	0
50	150		300	600	4320	.	38	0	60	0
51	600		2400	4800	260	.	19	0	480	200
52	300		800	800	40	.	5	0	240	200
53	300		0	150	270	.	19	70	0	250
54	1800		75	150	1080	.	19	70	0	250
55	1200		0	150	4320	.	19	70	0	250
56	75		300	150	135	.	19	0	480	250
57	300		75	400	4320	.	19	18	30	250
58	150		75	800	1080	.	38	0	240	0
59	112		150	3200	270	.	19	0	960	32
60	75		112	112	0	.	9	0	0	0
61	75		0	225	135	.	19	0	30	0
62	1200		75	200	6400	.	19	70	0	125
63	300		400	300	0	.	75	70	15	50

Tab.4a: Übersicht über alle Testergebnisse

NR	BKeim	Ausdehn	Komplik	Atopie	Beat	Alter	Sex	BeatG	AlterG
1	1	1	0	0	2.5	31	0	1	1
2	0	1	0	0	2.0	44	0	0	1
3	0	1	0	0	2.5	17	1	0	0
4	1	0	0	0	2.5	24	0	0	1
5	0	1	0	0	2.5	40	0	0	1
6	0	1	0	0	2.5	46	0	0	1
7	0	0	0	0	1.0	7	0	0	0
8	0	0	0	0	1.0	36	0	1	1
9	0	0	0	0	0.5	32	1	0	1
10	0	1	1	0	1.0	24	0	0	1
11	0	0	1	0	2.0	47	0	0	1
12	0	0	0	0	5.0	38	1	1	1
13	0	1	0	0	5.0	22	1	1	1
14	0	1	0	0	5.0	38	1	1	1
15	0	0	1	1	4.0	25	1	1	1
16	0	0	1	1	4.0	24	1	1	1
17	0	0	0	0	5.5	17	0	1	0
18	0	0	0	0	5.5	20	1	1	1
19	0	0	0	0	5.5	36	1	1	1
20	0	0	0	0	5.5	57	1	1	0
21	0	1	1	0	1.0	40	0	1	1
22	0	0	0	0	0.0	19	1	1	1
23	0	0	0	0	0.0	31	0	1	1
24	0	0	0	0	0.0	30	0	1	1
25	0	0	0	0	0.0	27	1	1	1
26	0	0	0	0	0.0	58	0	1	0
27	1	0	0	0	0.0	59	1	1	0
28	1	0	0	0	0.0	18	0	0	1
29	1	0	0	0	0.0	70	0	0	0
30	0	0	0	0	0.0	18	1	0	0
31	1	0	0	0	0.0	30	1	1	1
32	0	0	0	0	0.0	27	0	0	1
33	0	0	0	0	0.0	18	1	0	1
34	0	0	1	1	0.0	19	1	1	1
35	0	0	0	0	0.0	24	1	1	1
36	0	0	0	0	0.0	15	0	1	0
37	0	0	0	0	0.0	22	1	1	1
38	0	0	0	0	0.0	21	0	1	0
39	0	0	0	0	0.0	74	1	1	0
40	1	0	0	0	0.0	47	0	1	0
41	1	0	0	0	0.0	91	1	1	0
42	1	0	0	0	0.0	35	1	1	0
43	0	0	0	0	0.0	18	0	1	0
44	0	0	0	0	0.0	18	1	1	1
45	0	0	0	0	0.0	33	1	1	0
46	0	0	0	0	0.0	15	1	1	0
47	0	0	0	0	0.0	27	0	0	0
48	0	0	0	0	5.2	79	1	1	0
49	0	0	0	0	5.2	64	1	1	0
50	0	0	0	0	5.0	60	1	1	0
51	0	0	0	0	3.5	20	0	0	0
52	1	0	0	0	0.0	13	1	0	0
53	1	0	0	0	0.0	53	0	1	0
54	1	0	0	0	0.0	53	1	1	0
55	1	0	0	0	0.0	53	0	1	0
56	0	0	0	0	0.0	35	0	1	1
57	0	0	0	0	5.0	36	0	0	1
58	0	0	0	0	0.0	43	0	0	0
59	0	0	0	0	1.5	78	1	1	0
60	0	0	0	0	0.0	41	1	1	1
61	0	0	0	0	1.5	39	1	0	0
62	1	1	0	0	0.0	60	0	0	0
63	1	1	0	0	52.0	22	0	1	1

Tab.4b: Übersicht über alle Testergebnisse

4. Immunantwort bei Pyoderaien mit Gruppe A Streptokokken

4.1. Ergebnisse

4.1.1. Verteilung der Antikörperwerte

Im Scattergram der Tabelle 5 sind die ermittelten ASL 0-, AHase-, ADNase B-, ASk- und ANADase-Werte in E/ml bzw. Titerstufen aufgeführt. Ein dicker horizontaler Balken kennzeichnet die Grenzwerte, bis zu denen ein Antikörperwert als nicht signifikant erhöht zu betrachten ist.

1200 > **	3600 > *****	3600 > *****	1600 > **** *****	400 > ****
<= 1200 *****	<= 3600 * ***** *****	<= 3600 * ***** ***** *****	<= 1600 *** ***** *****	< 400 * *****
<= 600 ** ***** *****	< 1800 ***** ***** *****	< 800 ***** ***** *****	<= 400 * ***** ***** *****	< 200 ***** ***** *****
XXXXXXXXXXXX				
< 400 ** ***** *****	< 600 * ***** *****	< 400 ***** *****	< 200 *****	< 75 ***
< 200 ***** ***** *****	< 225 * ***** *****	< 200 * *****	< 150 ****	<= 50 **
< 150 ** ***** *****	<= 100 * *****	< 150 ***	< 100 *	< 30 **
< 75 * *****	< 50 *****	< 100	< 25 ***** ***** *****	< 5 *
ASL 0	AHase	ADNase B	ASk	ANADase

Tab. 5: Verteilung der Antikörperwerte

4.1.2. Prozentsatz signifikant erhöhter Antikörperwerte

4.1.2.1. Bei der Bestimmung nur jeweils eines Antikörpergehaltes.

Wie der Abb.1 zu entnehmen ist, sind 30 % der ASL O-, 48 % der AHyase-, 60 % der ASk-, 69 % der ADNase B- und 72 % der ANADase-Titer signifikant erhöht.

4.1.2.2. Bei der gleichzeitigen Bestimmung zweier oder mehrerer Antikörpertiter

Aus den Tabellen in Abb.2-5 ist zu entnehmen, welche Verteilungsmuster signifikant erhöhter ("1") bzw. noch "normaler" ("0") Antikörperwerte bei gleichzeitiger Durchführung zweier oder mehrerer Antikörpertests zu erhalten sind.

Bei der Durchführung von zwei Antikörpernachweisen erweisen sich die Bestimmung der ANADase und ASk mit 93 % "positiven" Titern, gefolgt von ANADase und ADNase B (88 %), ADNase B und ASk (84 %) sowie AHyase und ANADase (mit 82 % signifikant in mindestens einem Test erhöhten Werten) als effektivste Testkombinationen (Abb.2).

Bei der gleichzeitigen Bestimmung von ADNase B, ASk und ANADase sind 100 % aller getesteten Seren zumindest in einem Antikörpertiter eindeutig erhöht, in 96 % der Fälle trifft dies für die Kombinationen AHyase, ASk und ANADase zu und in 93 % der Fälle für ASL O/ASk/ANADase und AHyase/ADNase B/ANADase.

Die im Routinebetrieb am häufigsten durchgeführte Dreierkombination ASL O/AHyase/ADNase B führt in 85 % der Fälle zu mindestens einem positiven Seronachweis (Abb.3).

Mit den Kombinationen ASL O/ADNase B/ASk/ANADase und AHyase/ADNase B/ASk/ANADase sind 100 % der (bakteriologisch nachgewiesenen) Pyodermien auch serologisch erfaßt worden (Abb.4).

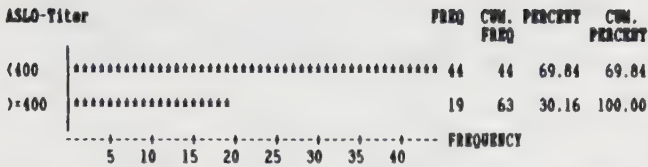
Fordert man für einen eindeutigen Seronachweis, daß mindestens 2 Antikörpertiter signifikant erhöht sein müssen, so erfüllen die unten aufgeführten Dreierkombinationen mit nachstehenden Prozentsätzen diese Bedingung:

ADNase B/ASk/ANADase: 73 %; AHyase/ADNase B/ANADase: 69 %;
AHyase/ADNase B/ASk : 62 %; ASL O/ADNase B/ANADase : 61 %;
... ASL O/AHyase/ADNase B: 48 %; ASL O/AHyase/ASk : 44 %.
(Abb.3)

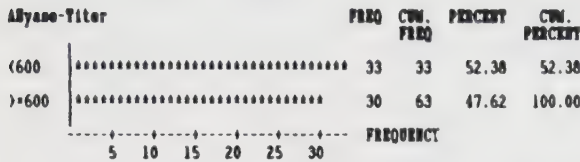
4.1.2.3. Effektivste Testkombination zum serologischen Nachweis von Pyodermien für die Routinediagnostik

Von den routinemäßig am häufigsten verwendeten Tests zum Nachweis von Streptokokkenkrankungen, nämlich ASL O, AHyase und ADNase B erwies sich für das untersuchte Patientengut, also bei Pyodermien, die gleichzeitige Bestimmung von ASL O und ADNase B mit 20 % "negativen" Titern am geeignetsten. (S.Abb.2)

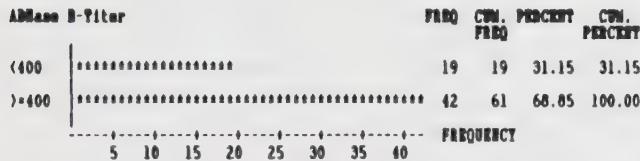
Wird die ASR als primärer serologischer Test durchgeführt, erhält man durch den ANADase-Nachweis die meisten zusätzlichen positiven Titer (54 %), gefolgt von ADNase B- (49 %), ASk- (41 %) und AHyase-Nachweis (32 %). (Abb.2)



Prozentsatz signifikant erhöhter ASL O-Titer



Prozentsatz signifikant erhöhter ABase-Titer



Prozentsatz signifikant erhöhter ADHase B-Titer



Prozentsatz signifikant erhöhter ASk-Titer



Prozentsatz signifikant erhöhter ANADase-Titer

Abb. 1: Prozentsatz signifikant erhöhter Antikörperverte

AHYALG	ASLG	FREQUENCY	PERCENT	CUMULATIVE	CUMULATIVE
				FREQUENCY	PERCENT
0	0	24	38.1	24	38.1
0	1	9	14.3	33	52.4
1	0	20	31.7	53	84.1
1	1	10	15.9	63	100.0

ADNBG	ASLG	FREQUENCY	PERCENT	CUM.FREQU.	CUM.PERC.
0	0	12	19.7	12	19.7
0	1	7	11.5	19	31.1
1	0	30	49.2	49	80.3
1	1	12	19.7	61	100.0

ASKG	ASLG	FREQUENCY	PERCENT	CUM.FREQU.	CUM.PERC.
0	0	18	28.6	18	28.6
0	1	7	11.1	25	39.7
1	0	26	41.3	51	81.0
1	1	12	19.0	63	100.0

ANADG	ASLG	FREQUENCY	PERCENT	CUM.FREQU.	CUM.PERC.
0	0	8	28.6	8	28.6
1	0	15	53.6	23	82.1
1	1	5	17.9	28	100.0

ADNBG	AHYALG	FREQUENCY	PERCENT	CUM.FREQU.	CUM.PERC.
0	0	16	26.2	16	26.2
0	1	3	4.9	19	31.1
1	0	15	24.6	34	55.7
1	1	27	44.3	61	100.0

Abb.2: Verteilungsmuster signifikant erhöhter ("1") bzw. nicht erhöhter ("0") Antikörperwerte bei der Durchführung von 2 Antikörpertests

ASKG	ANYALG	FREQUENCY	PERCENT	CUM.FREQU.	CUM.PERC.
0	0	15	23.8	15	23.8
0	1	10	15.9	25	39.7
1	0	18	28.6	43	68.3
1	1	20	31.7	63	100.0

ANADG	ANYALG	FREQUENCY	PERCENT	CUM.FREQU.	CUM.PERC.
0	0	5	17.9	5	17.9
0	1	3	10.7	8	28.6
1	0	8	28.6	16	57.1
1	1	12	42.9	28	100.0

ASKG	ADNBG	FREQUENCY	PERCENT	CUM.FREQU.	CUM.PERC.
0	0	10	16.4	10	16.4
0	1	13	21.3	23	37.7
1	0	9	14.8	32	52.5
1	1	29	47.5	61	100.0

ANADG	ADNBG	FREQUENCY	PERCENT	CUM.FREQU.	CUM.PERC.
0	0	3	11.5	3	11.5
0	1	5	19.2	8	30.8
1	0	3	11.5	11	42.3
1	1	15	57.7	26	100.0

ANADG	ASKG	FREQUENCY	PERCENT	CUM.FREQU.	CUM.PERC.
0	0	2	7.1	2	7.1
0	1	6	21.4	8	28.6
1	0	9	32.1	17	60.7
1	1	11	39.3	28	100.0

Abb.2: Verteilungsmuster signifikant erhöhter ("1") bzw. nicht erhöhter ("0") Antikörperteste bei der Durchführung von 2 Antikörpertests

ADNBG	ASLG	ANYALG	FREQUENCY	PERCENT	CUMULATIVE FREQUENCY	CUMULATIVE PERCENT
0	0	0	9	14.8	9	14.8
0	0	1	3	4.9	12	19.7
0	1	0	7	11.5	19	31.1
1	0	0	13	21.3	32	52.5
1	0	1	17	27.9	49	80.3
1	1	0	2	3.3	51	83.6
1	1	1	10	16.4	61	100.0

ASKG	ASLG	ANYALG	FREQUENCY	PERCENT	CUM.FREQU.	CUM.PERC.
0	0	0	11	17.5	11	17.5
0	0	1	7	11.1	18	28.6
0	1	0	4	6.3	22	34.9
0	1	1	3	4.8	25	39.7
1	0	0	13	20.6	38	60.3
1	0	1	13	20.6	51	81.0
1	1	0	5	7.9	56	88.9
1	1	1	7	11.1	63	100.0

ANADG	ASLG	ANYALG	FREQUENCY	PERCENT	CUM.FREQU.	CUM.PERC.
0	0	0	5	17.9	5	17.9
0	0	1	3	10.7	8	28.6
1	0	0	7	25.0	15	53.6
1	0	1	8	28.6	23	82.1
1	1	0	1	3.6	24	85.7
1	1	1	4	14.3	28	100.0

ASKG	ASLG	ADNBG	FREQUENCY	PERCENT	CUM.FREQU.	CUM.PERC.
0	0	0	7	11.5	7	11.5
0	0	1	9	14.8	16	26.2
0	1	0	3	4.9	19	31.1
0	1	1	4	6.6	23	37.7
1	0	0	5	8.2	28	45.9
1	0	1	21	34.4	49	80.3
1	1	0	4	6.6	53	86.9
1	1	1	8	13.1	61	100.0

ANADG	ASLG	ADNBG	FREQUENCY	PERCENT	CUM.FREQU.	CUM.PERC.
0	0	0	3	11.5	3	11.5
0	0	1	5	19.2	8	30.8
1	0	0	2	7.7	10	38.5
1	0	1	11	42.3	21	80.8
1	1	0	1	3.8	22	84.6
1	1	1	4	15.4	26	100.0

Abb.3: Verteilungsmuster signifikant erhöhter ("1") bzw. nicht erhöhter ("0") Antikörperwerte bei der Durchführung von 3 Antikörpertests

ANADG	ASLG	ASKG	FREQUENCY	PERCENT	CUM.FREQU.	CUM.PERC.
0	0	0	2	7.1	2	7.1
0	0	1	6	21.4	8	28.6
1	0	0	7	25.0	15	53.6
1	0	1	8	28.6	23	82.1
1	1	0	2	7.1	25	89.3
1	1	1	3	10.7	28	100.0

ASKG	ANYALG	ADNBG	FREQUENCY	PERCENT	CUM.FREQU.	CUM.PERC.
0	0	0	8	13.1	8	13.1
0	0	1	5	8.2	13	21.3
0	1	0	2	3.3	15	24.6
0	1	1	8	13.1	23	37.7
1	0	0	8	13.1	31	50.8
1	0	1	10	16.4	41	67.2
1	1	0	1	1.6	42	68.9
1	1	1	19	31.1	61	100.0

ANADG	ANYALG	ADNBG	FREQUENCY	PERCENT	CUM.FREQU.	CUM.PERC.
0	0	0	2	7.7	2	7.7
0	0	1	3	11.5	5	19.2
0	1	0	1	3.8	6	23.1
0	1	1	2	7.7	8	30.8
1	0	0	2	7.7	10	38.5
1	0	1	4	15.4	14	53.8
1	1	0	1	3.8	15	57.7
1	1	1	11	42.3	26	100.0

ANYALG	ASKG	ANADG	FREQUENCY	PERCENT	CUM.FREQU.	CUM.PERC.
0	0	0	1	3.6	1	3.6
0	0	1	5	17.9	6	21.4
0	1	0	4	14.3	10	35.7
0	1	1	3	10.7	13	46.4
1	0	0	1	3.6	14	50.0
1	0	1	4	14.3	18	64.3
1	1	0	2	7.1	20	71.4
1	1	1	8	28.6	28	100.0

ADNBG	ASKG	ANADG	FREQUENCY	PERCENT	CUM.FREQU.	CUM.PERC.
0	0	1	2	7.7	2	7.7
0	1	0	3	11.5	5	19.2
0	1	1	1	3.8	6	23.1
1	0	0	2	7.7	8	30.8
1	0	1	5	19.2	13	50.0
1	1	0	3	11.5	16	61.5
1	1	1	10	38.5	26	100.0

Abb.3: Verteilungsmuster signifikant erhöhter ("1") bzw. nicht erhöhter ("0") Antikörperteste bei der Durchführung von 3 Antikörpertests

ASKG	ASLG	ANYALG	ADMBG	FREQUENCY	PERCENT	CUMULATIVE FREQUENCY	CUM. PERC.
0	0	0	0	5	8.2	5	8.2
0	0	0	1	4	6.6	9	14.8
0	0	1	0	2	3.3	11	18.0
0	0	1	1	5	8.2	16	26.2
0	1	0	0	3	4.9	19	31.1
0	1	0	1	1	1.6	20	32.8
0	1	1	1	3	4.9	23	37.7
1	0	0	0	4	6.6	27	44.3
1	0	0	1	9	14.8	36	59.0
1	0	1	0	1	1.6	37	60.7
1	0	1	1	12	19.7	49	80.3
1	1	0	0	4	6.6	53	86.9
1	1	0	1	1	1.6	54	88.5
1	1	1	1	7	11.5	61	100.0

ANADG	ASLG	ANYALG	ADMBG	FREQUENCY	PERCENT	CUM.FREQU.	CUM.P.
0	0	0	0	2	7.7	2	7.7
0	0	0	1	3	11.5	5	19.2
0	0	1	0	1	3.8	6	23.1
0	0	1	1	2	7.7	8	30.8
1	0	0	0	1	3.8	9	34.6
1	0	0	1	4	15.4	13	50.0
1	0	1	0	1	3.8	14	53.8
1	0	1	1	7	26.9	21	80.8
1	1	0	0	1	3.8	22	84.6
1	1	1	1	4	15.4	26	100.0

ANADG	ASLG	ANYALG	ASKG	FREQUENCY	PERCENT	CUM.FREQU.	CUM.P.
0	0	0	0	1	3.6	1	3.6
0	0	0	1	4	14.3	5	17.9
0	0	1	0	1	3.6	6	21.4
0	0	1	1	2	7.1	8	28.6
1	0	0	0	4	14.3	12	42.9
1	0	0	1	3	10.7	15	53.6
1	0	1	0	3	10.7	18	64.3
1	0	1	1	5	17.9	23	82.1
1	1	0	0	1	3.6	24	85.7
1	1	1	0	1	3.6	25	89.3
1	1	1	1	3	10.7	28	100.0

Abb.4: Verteilungsmuster signifikant erhöhter ("1") bzw. nicht erhöhter ("0") Antikörpertests bei der Durchführung von 4 Antikörpertests

ASLG	ADNBG	ASKG	ANADG	FREQUENCY	PERCENT	CUM.FREQU.	CUM.P.
0	0	0	1	1	3.8	1	3.8
0	0	1	0	3	11.5	4	15.4
0	0	1	1	1	3.8	5	19.2
0	1	0	0	2	7.7	7	26.9
0	1	0	1	4	15.4	11	42.3
0	1	1	0	3	11.5	14	53.8
0	1	1	1	7	26.9	21	80.8
1	0	0	1	1	3.8	22	84.6
1	1	0	1	1	3.8	23	88.5
1	1	1	1	3	11.5	26	100.0

AHYALG	ADNBG	ASKG	ANADG	FREQUENCY	PERCENT	CUM.FREQU.	CUM.P.
0	0	0	1	1	3.8	1	3.8
0	0	1	0	2	7.7	3	11.5
0	0	1	1	1	3.8	4	15.4
0	1	0	0	1	3.8	5	19.2
0	1	0	1	2	7.7	7	26.9
0	1	1	0	2	7.7	9	34.6
0	1	1	1	2	7.7	11	42.3
1	0	0	1	1	3.8	12	46.2
1	0	1	0	1	3.8	13	50.0
1	1	0	0	1	3.8	14	53.8
1	1	0	1	3	11.5	17	65.4
1	1	1	0	1	3.8	18	69.2
1	1	1	1	8	30.8	26	100.0

Abb. 4: Verteilungsmuster signifikant erhöhter ("1") bzw. nicht erhöhter ("0") Antikörperverte bei der Durchführung von 4 Antikörpertests

ANADG	ASKG	ADNBG	AHYALG	ASLG	FREQUENCY	PERCENT	CUMULATIVE FREQUENCY	CUMULATIVE PERCENT
0	0	1	0	0	1	3.8	1	3.8
0	0	1	1	0	1	3.8	2	7.7
0	1	0	0	0	2	7.7	4	15.4
0	1	0	1	0	1	3.8	5	19.2
0	1	1	0	0	2	7.7	7	26.9
0	1	1	1	0	1	3.8	8	30.8
1	0	0	0	1	1	3.8	9	34.6
1	0	0	1	0	1	3.8	10	38.5
1	0	1	0	0	2	7.7	12	46.2
1	0	1	1	0	2	7.7	14	53.8
1	0	1	1	1	1	3.8	15	57.7
1	1	0	0	0	1	3.8	16	61.5
1	1	1	0	0	2	7.7	18	69.2
1	1	1	1	0	5	19.2	23	88.5
1	1	1	1	1	3	11.5	26	100.0

Abb. 5: Verteilungsmuster signifikant erhöhter ("1") bzw. nicht erhöhter ("0") Antikörperverte bei der Durchführung von 5 Antikörpertests

4.1.3. Signifikante Mittelwertunterschiede bei verschiedenen klinischen Parametern

In den Abschnitten 4.1.3.1. bis 4.1.3.6. sind signifikante Mittelwertunterschiede bei verschiedenen klinischen Parametern aufgeführt.

Der Wert $\text{PROB} > T$ gibt die Irrtumswahrscheinlichkeit für den Mittelwertunterschied an. Wie anhand des std error of mean ersichtlich ist, überschneiden sich die Streuungsbereiche der Mittelwerte nicht.

Die Ergebnisse der Abschnitte 4.1.3.1. bis 4.1.3.6. sind in Tabelle 6a zusammengefaßt.

AK-Nach- weis	klinischer Parameter	Mittelwerte f. die ver- schiedenen Parameterwerte	p-Wert f. MW- Unterschiede
AHyase	Bestandadauer	(<2Wo: 2.141 ; >2Wo: 2.663	0.0424
ASL 0	Begleitkeim	0: 2.175 ; 1: 2.537	0.0006
ASL 0	Komplik.grad	0: 2.237 ; 1: 2.490	0.0268
AHyase	Atop.Diath.	0: 2.330 ; 1: 2.952	0.0094
ASL 0	Altersgruppe	1: 2.236 ; 0: 2.532	0.0081
ASK	Altersgruppe	1: 1.757 ; 0: 2.650	0.0071

Tabelle 6a: Signifikante Mittelwertunterschiede für verschiedene klinische Parameter

Wie die Tabelle 6b verdeutlicht, spiegeln sich diese signifikanten Mittelwertunterschiede noch stärker im Prozentsatz signifikant erhöhter Antikörper-Titer wider:

AK-Nach- weis	klinischer Parameter	%-satz signifikant erhöhter AK-Titer f.die verschiedenen Parameterwerte
AHyase	Bestandsdauer	< = 2Wo: 29 % ; > 2Wo: 53 %
ASL 0	Begleitkeim	0 : 20 % ; 1 : 44 %
ASL 0	Komplik.grad	0 : 27 % ; 1 : 35 %
AHyase	Atop.Diath.	0 : 32 % ; 1 : 76 %
ASL 0	Alteragruppe	1 : 24 % ; 0 : 43 %
ASk	Alteragruppe	1 : 50 % ; 0 : 81 %

Tabelle 6b: Prozentsatz signifikant erhöhter Antikörper-Titer für verschiedene klinische Parameter mit signifikanten Mittelwertunterschieden

Die Tabellen 6c, d und e untersuchen, ob die signifikanten Mittelwertunterschiede ursprünglicher Art sind, oder durch verschiedene Bestandsdauern bedingt sind. (S. Diskussion)

AK-Nach- weis	Best. dauer	Klin. Param.	Mittelwerte f. die ver- schiedenen Parameterwerte	p-Wert f.MW- Unterschiede
ASL 0	<=2Wo	BKeim	0: 2.207 ; 1: 2.457	0.2188
	> 2Wo		0: 2.165 ; 1: 2.555	0.0018
ASL 0	<=2Wo	Kom-	0: 2.218 ; 1: 2.301	0.6995
	> 2Wo	plik	0: 2.243 ; 1: 2.523	0.0460
AHyase	<=2Wo	Atop.	0: 2.165 ; 1: 1.628	0.3865
	> 2Wo	Diat.	0: 2.391 ; 1: 3.091	0.0075
ASL 0	<=2Wo	Alt.-	0: 2.521 ; 1: 2.234	0.1559
	> 2Wo	gr.	0: 2.535 ; 1: 2.236	0.0257
ASk	<=2Wo	Alt.-	0: 2.743 ; 1: 2.346	0.4369
	> 2Wo	gr.	0: 2.628 ; 1: 1.573	0.0059

Tabelle 6c: Signifikante Mittelwertunterschiede für verschiedene klinische Parameter unter Berücksichtigung der Bestandsdauer

AK-Nach- weis	Best. dauer	Klin. Param.	%satz signif. erhöhter AK-Titer f. die versch. Parameterwerte			
ASL 0	<=2Wo	BKeim	0 :	13 %	;	1 : 40 %
	> 2Wo		0 :	22 %	;	1 : 46 %
ASL 0	<=2Wo	Kom- plik	0 :	11 %	;	1 : 33 %
	> 2Wo		0 :	31 %	;	1 : 35 %
AHyase	<=2Wo	Atop. Diat.	0 :	18 %	;	1 : 50 %
	> 2Wo		0 :	37 %	;	1 : 79 %
ASL 0	<=2Wo	Alt.- gr.	0 :	25 %	;	1 : 20 %
	> 2Wo		0 :	47 %	;	1 : 25 %
ASk	<=2Wo	Alt.- gr.	0 :	75 %	;	1 : 70 %
	> 2Wo		0 :	82 %	;	1 : 44 %

Tabelle 6d: Prozentsatz signifikant erhöhter Antikörper-Titer für verschiedene klinische Parameter mit signifikanten Mittelwertunterschieden unter Berücksichtigung der Bestandsdauer

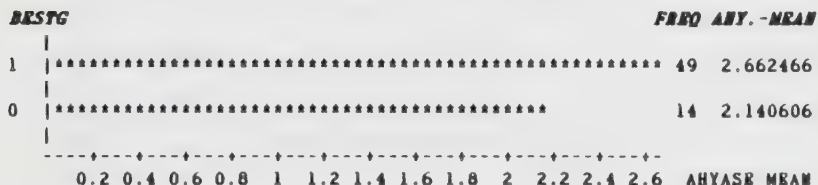
AK-Nach- weis	Klin. Param.	Mittelwerte f. Bestands- dauer 0:<=2 Wo u. 1:>2Wo		p-Wert f. MW- Unterschiede
ASL 0	BKeim	0 :	2.212 ; 1: 2.165	0.7375
		0 :	2.202 ; 1: 2.555	0.0354/0.2407
ASL 0	Kom- plik	0 :	2.223 ; 1: 2.243	0.9034
		0 :	2.151 ; 1: 2.523	0.2862
AHyase	Atop. Diat.	0 :	2.160 ; 1: 2.391	0.5316
		0 :	1.628 ; 1: 3.091	0.0140
ASL 0	Alt.- gr.	0 :	2.263 ; 1: 2.535	0.4018
		0 :	2.195 ; 1: 2.236	0.7310
ASk	Alt.- gr.	0 :	2.216 ; 1: 2.628	0.6259
		0 :	2.212 ; 1: 1.573	0.2048

Tabelle 6e: Signifikante Mittelwertunterschiede für verschiedene Bestandsdauer unter Berücksichtigung der klinischen Parameter

**4.1.3.1. Signifikanter Mittelwertunterschied der
Antihyaluronidase-Titer bei verschiedenen
Bestandsgruppen**

TTEST PROCEDURE for VARIABLE: AHYase						
BESTG	N	MEAN	STD DEV	STD ERROR	MINIMUM	MAXIMUM
0	14	2.14060604	0.77029924	0.20587113	0	3.25527251
1	49	2.66246602	0.91346862	0.13049552	0	3.98227123
VARIANCES		T	DF	PROB > T		
UNEQUAL		-2.1410	24.5	0.0424		
EQUAL		-1.9460	61.0	0.0563		

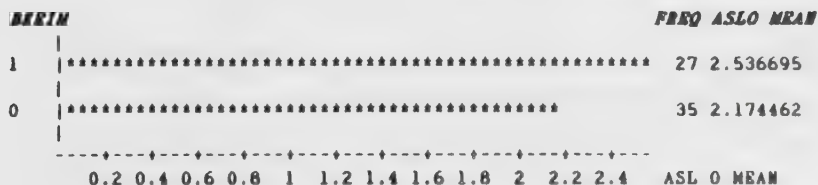
FOR HO: VARIANCES ARE EQUAL, F' = 1.41 WITH 48 AND 13 DF
PROB > F' = 0.5136



**4.1.3.2. Signifikanter Mittelwertunterschied der
Antistreptolysin O-Titer bei Anwesen-/Abwesenheit
von Staph. aureus**

TTEST PROCEDURE for VARIABLE: ASL O						
BREIN	N	MEAN	STD DEV	STD ERROR	MINIMUM	MAXIMUM
0	35	2.17446161	0.34174211	0.05776496	1.69897000	2.95424251
1	27	2.53669499	0.44876630	0.08636511	1.60205999	3.55630250
VARIANCES		T	DF	PROB > T		
UNEQUAL		-3.4863	47.2	0.0011		
EQUAL		-3.6102	60.0	0.0006		

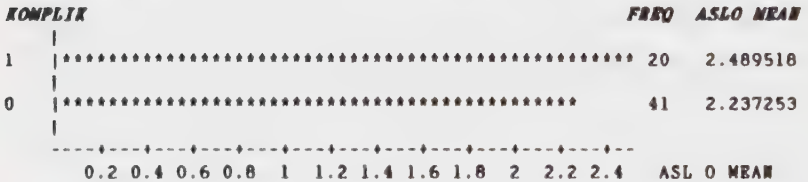
FOR HO: VARIANCES ARE EQUAL, F' = 1.72 WITH 26 AND 34 DF
PROB > F' = 0.1357



4.1.3.3. Signifikanter Mittelwertunterschied der Antistreptolysin O-Titer bei unterschiedlichem Komplikationsgrad

TTEST PROCEDURE for VARIABLE: ASL O							
KOMPLIK	N	MEAN	STD DEV	STD ERROR	MINIMUM	MAXIMUM	
0	41	2.23725297	0.38877244	0.06071605	1.60205999	3.07918125	
1	20	2.48951840	0.44358330	0.09918824	2.00000000	3.55630250	
VARIANCES							
	T	DF	PROB > T				
UNEQUAL	-2.1692	33.7	0.0372				
EQUAL	-2.2712	59.0	0.0268				

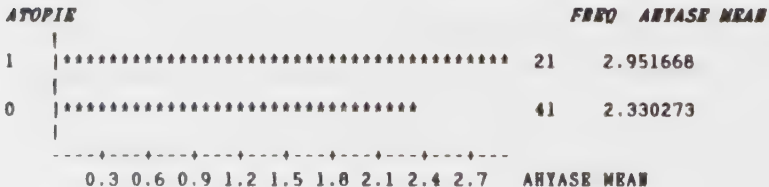
FOR H0: VARIANCES ARE EQUAL, F' = 1.30 WITH 19 AND 40 DF
PROB > F' = 0.4715



4.1.3.4. Signifikanter Mittelwertunterschied der Antihyaluronidase-Titer bei fehlender/vorhandener atopischer Diathese

TTEST PROCEDURE for VARIABLE: ANYASE							
ATOPIE	N	MEAN	STD DEV	STD ERROR	MINIMUM	MAXIMUM	
0	41	2.33027327	0.88485820	0.13819163	0	3.98227123	
1	21	2.95166788	0.83430006	0.18205920	0	3.98227123	
VARIANCES							
	T	DF	PROB > T				
UNEQUAL	-2.7187	42.6	0.0094				
EQUAL	-2.6668	60.0	0.0098				

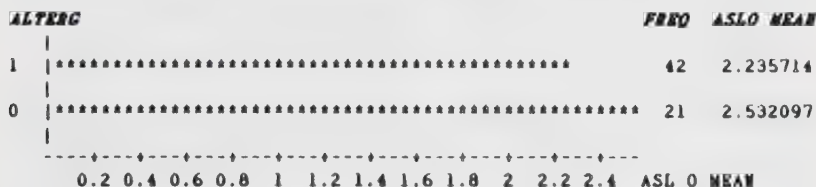
FOR H0: VARIANCES ARE EQUAL, F' = 1.12 WITH 40 AND 20 DF
PROB > F' = 0.7980



4.1.3.5. Signifikanter Mittelwertunterschied der Antistreptolysin O-Titer in den unterschiedlichen Altersklassen

TTEST PROCEDURE for VARIABLE: ASL O						
ALTERG	N	MEAN	STD DEV	STD ERROR	MINIMUM	MAXIMUM
0	21	2.53209714	0.51568079	0.11253077	1.60205999	3.55630250
1	42	2.23571435	0.33782758	0.05212793	1.69897000	2.95424251
VARIANCES						
	T	DF	PROB > T			
UNEQUAL	2.3898	28.9	0.0236			
EQUAL	2.7392	61.0	0.0081			

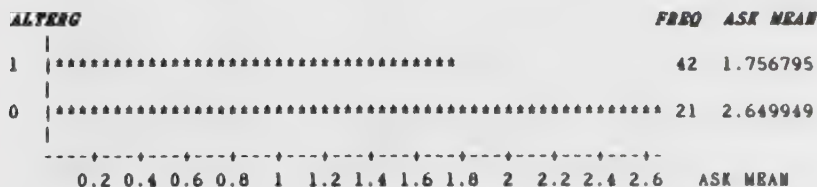
FOR H0: VARIANCES ARE EQUAL, F' = 2.33 WITH 20 AND 41 DF
PROB > F' = 0.0217



4.1.3.6. Signifikanter Mittelwertunterschied der Antistreptokinase-Titer in den unterschiedlichen Altersklassen

TTEST PROCEDURE for VARIABLE: ASK						
ALTERG	N	MEAN	STD DEV	STD ERROR	MINIMUM	MAXIMUM
0	21	2.64994899	1.06585230	0.23258804	0	4.23754374
1	42	1.75679492	1.25950652	0.19434608	0	3.63548375
VARIANCES						
	T	DF	PROB > T			
UNEQUAL	2.9468	46.6	0.0050			
EQUAL	2.7861	61.0	0.0071			

FOR H0: VARIANCES ARE EQUAL, F' = 1.40 WITH 41 AND 20 DF
PROB > F' = 0.4260



4.1.4. Korrelation der verschiedenen Antikörper

4.1.4.1. Ohne Berücksichtigung klinischer Parameter

In Tab.7 sind die Pearsonschen Korrelationskoeffizienten zwischen den einzelnen Antikörpern aufgeführt und die Irrtumswahrscheinlichkeiten für das Vorhandensein einer positiven oder negativen Korrelation. Wie aus Tab.7 ersichtlich ist, korrelieren die AHYase- und ADNase B-Werte mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner 0.01 % (p-Wert < 0.0001). Von den übrigen Kombinationsmöglichkeiten lassen lediglich ANADase und ADNase B, ASL O und ASk sowie ASLO und ANADase eine etwa gleichgerichtete Antikörpertiterverteilung erkennen (p-Werte < 0.051, 0.064 bzw 0.079).

VARIABLE	N	MEAN	STD DEV	MINIMUM	MAXIMUM
ASL O	63	2.3345086	0.4255463	1.6020600	3.5563025
AHYAL	63	2.5464971	0.9045721	0.0000000	3.9822712
ADNB	61	2.9137181	0.6008242	2.0492180	4.2833012
ASK	63	2.0545129	1.2631858	0.0000000	4.2375437
ANAD	28	2.0404464	0.6084125	0.0000000	3.2833012

PEARSON CORRELATION COEFFICIENTS/PROB > |R| UNDER H0:RHO=0
NUMBER OF OBSERVATIONS

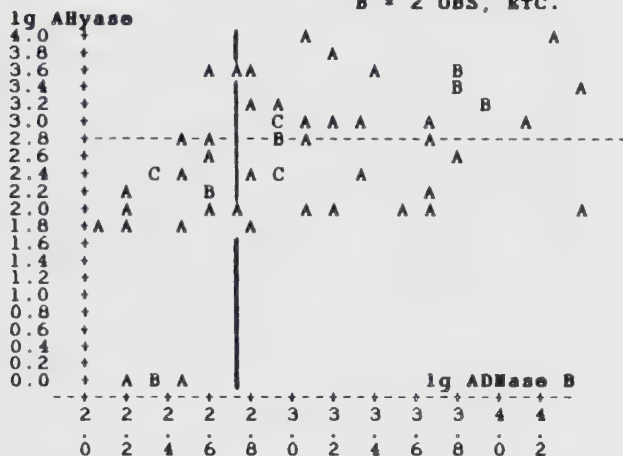
	ASL O	AHYAL	ADNB	ASK	ANAD
ASL O	1.00000	0.03803	0.17383	0.23560	0.33818
	0.0000	0.7673	0.1803	0.0631	0.0784
	63	63	61	63	28
AHYAL	0.03803	1.00000	0.48735	-0.00438	0.16852
	0.7673	0.0000	0.0001	0.9729	0.3913
	63	63	61	63	28
ADNB	0.17383	0.48735	1.00000	0.02885	0.38714
	0.1803	0.0001	0.0000	0.8253	0.0507
	61	61	61	61	26
ASK	0.23560	-0.00438	0.02885	1.00000	-0.04558
	0.0631	0.9729	0.8253	0.0000	0.8179
	63	63	61	63	28
ANAD	0.33818	0.16852	0.38714	-0.04558	1.00000
	0.0784	0.3913	0.0507	0.8179	0.0000
	28	28	26	28	28

Tab.7: Korrelation zwischen den verschiedenen Antikörpern

Die Antikörperwerte der Kombinationen AHyase/ADNase B und ANADase/ADNase B sind in Abb.6 und 7 gegeneinander aufgetragen. Die senkrecht und waagrecht gestrichelten Linien markieren die Grenzwerte für signifikant erhöhte Antikörpertiter.

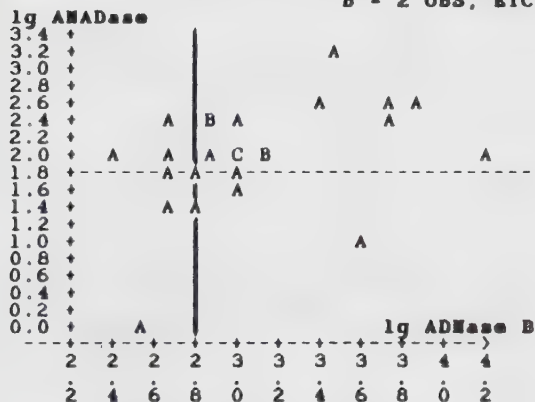
PLOT OF AHYAL*ADNB

LEGEND: A = 1 OBS,
B = 2 OBS, ETC.



PLOT OF ANAD*ADNB

LEGEND: A = 1 OBS,
B = 2 OBS, ETC.



4.1.4.2. Korrelation zwischen den verschiedenen Antikörpern unter Berücksichtigung klinischer Parameter

4.1.4.2.1. Einfluß des Faktors Begleitkeim

Die Aufstellung in Tab.8 gibt Aufschluß über den Einfluß der Anwesenheit (=1) oder der Abwesenheit (=0) von Staph. aureus im erkrankten Hautbereich auf die Korrelation zwischen den einzelnen Antikörpern. Die Zahlen hinter den verglichenen Antikörpern geben den Korrelationskoeffizienten (nach Pearson), die Irrtumswahrscheinlichkeit für das Vorhandensein einer Korrelation und die Anzahl der Beobachtungen an. Die Graphiken in den Abb.8 und 9 zeigen die Verteilung der Antikörperwerte bei signifikanter Korrelation. Die waagerechten und senkrechten Striche markieren den Grenzwert noch im Normbereich liegender, d.h. nicht signifikant erhöhter Titer.

4.1.4.2.2. Einfluß des Faktors Ausdehnung

Der Einfluß von geringer oder großer Ausdehnung auf die Korrelation der Antikörperwerte von ASL O/ANADase und ADNase B/ANADase ist ebenfalls Tab.8 zu entnehmen. Die Verteilung entsprechender Antikörperwerte demonstrieren Abb.10 und 11.

Antikörper- Tests	Korrelations- koeffizient	Irrtumswahr- scheinlichk.	Fre- quenz	klinische Parameter
ASL O/ANADase	0.44754	0.0479	20	BKeim=0
ASL O/ANADase	0.28252	0.4978	8	BKeim=1
ASL O/ADNase B	0.68138	0.0009	20	BKeim=0 & Sex=0
ASL O/ADNase B	-0.21874	0.4157	16	BKeim=1 & Sex=0
ANADase/ADNaseB	0.72701	0.0074	12	BKeim=0 & Sex=0
ANADase/ADNaseB	-0.00252	0.9962	6	BKeim=1 & Sex=0
ASL O/ANADase	0.18687	0.4883	16	Ausdehnung=0
ASL O/ANADase	0.63691	0.0259	12	Ausdehnung=1
ANADase/ADNaseB	0.70057	0.0053	14	Ausdehnung=0
ANADase/ADNaseB	0.20827	0.5160	12	Ausdehnung=1

Tab.8: Einfluß der Faktoren Begleitkeim und Ausdehnung der Erkrankung auf die Korrelation zwischen den verschiedenen Antikörpern

PLOT OF ANAD*ASLO LEGEND: A = 1
OBS, B = 2 OBS, ETC.

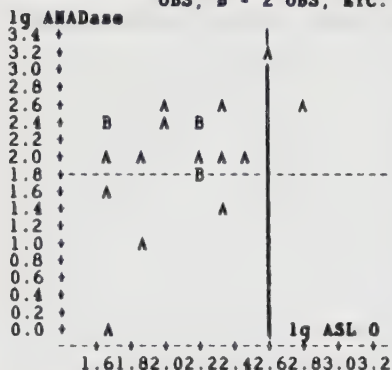


Abb.8: Korrelation der ANADase-
und ASL O-Titer bei negativen
Nachweis von Begleitkeimen

PLOT OF ASLO*ADHB LEGEND: A=1 OBS,
B=2 OBS, ETC.

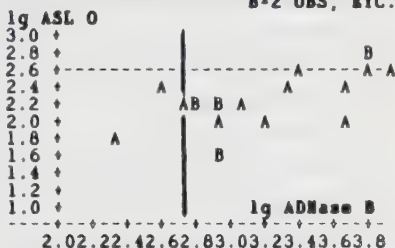


Abb.9: Korrelation der ASL O-
und ADHase B-Titer bei weib-
lichen Patienten mit negativen
Begleitkeimsachweis

PLOT OF ANAD*ASLO LEGEND: A = 1
OBS, B = 2 OBS, ETC.

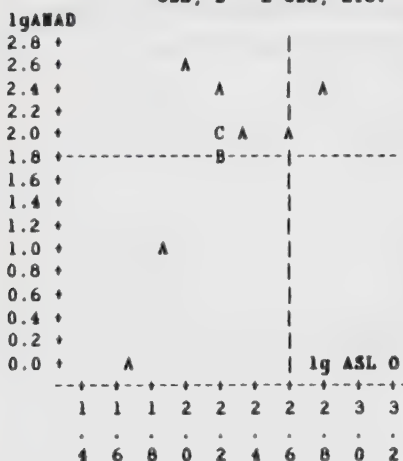


Abb.10: Korrelation der ANADase-
und ASL O-Titer bei Pyodermien
mit großer Ausdehnung

PLOT OF ANAD*ADHB LEGEND: A=1 OBS,
B=2 OBS, ETC.

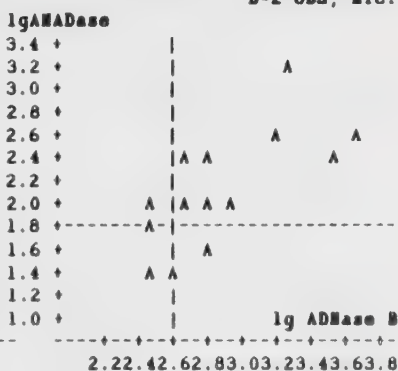


Abb.11: Korrelation der ADHase B-
und ANADase-Titer bei geringer
Ausdehnung

4.1.4.2.3. Einfluß der Bestandsdauer der Erkrankung auf den Korrelationsgrad verschiedener Antikörper

Aus der Aufstellung in Tab.9 läßt sich der Einfluß der Bestandsdauer der Erkrankung auf die Korrelation verschiedener Antikörper entnehmen. Man kann dieser Aufstellung entnehmen, daß die ASL O-Titer bei geringer Bestandsdauer nicht mit den ADNase B- und ANADase-Werten signifikant korrelieren, der Korrelationskoeffizient sogar negativ ist. Bei einer Bestandsdauer größer 2 Wochen allerdings, läßt sich eine positive und signifikante Korrelation der ASL O-Titer mit den ADNase B- bzw. ANADase-Werten feststellen.

Diesen Sachverhalt vermitteln auch die Plots in den Abbildungen 12 und 13.

4.1.4.2.4. Einfluß des Komplikationsgrades der Erkrankung auf den Korrelationsgrad verschiedener Antikörper

Wie aus Tab.9 und Abb.14 folgt, findet sich eine gute Korrelation der Antikörperwerte von ASL O und ADNase B, wenn die Keime keinen unmittelbaren Kontakt zu tieferen Blutgefäßen besitzen.

Beim Vergleich der ASk- und ASL O-Titer zeigt sich allerdings ein umgekehrtes Verhalten: Wie die Tab.9 und die Abbildungen 15 und 16 zeigen, sind die ASk-/ASL O-Antikörperwerte für den Komplikationsgrad 0 nicht positiv korreliert. Wenn die Erkrankungsdauer geringer als 2 Wochen war, finden wir sogar eine signifikant negative Korrelation vor. Bei einer Bestandsdauer größer 2 Wochen und gleichzeitigem direkten Kontakt der Bakterien mit tieferen Hautschichten besteht dagegen, mit einer Signifikanz > 95% eine positive Korrelation (Abb.16).

Antikörper- Tests	Korrelations- koeffizient	Irrtumswahr- scheinlich.	Fre- quenz	klinische Parameter
ASL O/AMADase	-0.28999	0.5281	7	Bestg=0
ASL O/AMADase	0.42466	0.0550	21	Bestg=1
ASL O/ADMase B	-0.73846	0.0039	13	Bestg=0
ASL O/ADMase B	0.29030	0.0453	48	Bestg=1
ASL O/ADMase B	0.34404	0.0320	39	Komplik=0
ASL O/ADMase B	-0.06860	0.7738	20	Komplik=1
ASL O/ASK	-0.67013	0.0483	9	Komplik=0Bestg=0
ASL O/ASK	0.07318	0.6906	32	Komplik=0Bestg=1
ASL O/ASK	0.48782	0.0470	17	Komplik=1Bestg=1

Tab.9: Einfluß der Bestandsdauer und des Komplikations-
grades auf die Korrelation der Antikörpertwerte

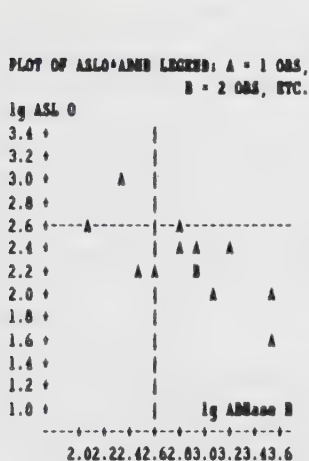


Abb.12: Korrelation der AMase B-
und ASL O-Titer bei Pyodermit mit
einer Bestandsdauer kleiner 2 Wochen
(="Bestg=0")

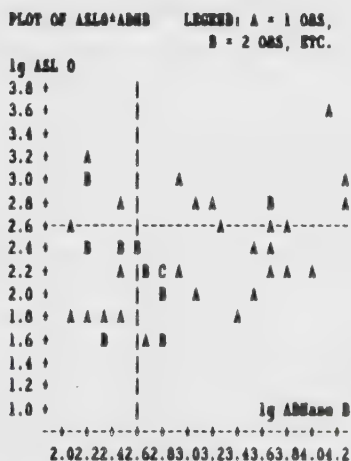


Abb.13: Korrelation der AMase B- und ASL
O-Titer bei Pyodermit mit einer Bestands-
dauer größer 2 Wochen (= "Bestg=1")



Abb. 14: Korrelation der ABW B- und ASL 0-Titer bei unkompliziert verlaufenden Pyodermien

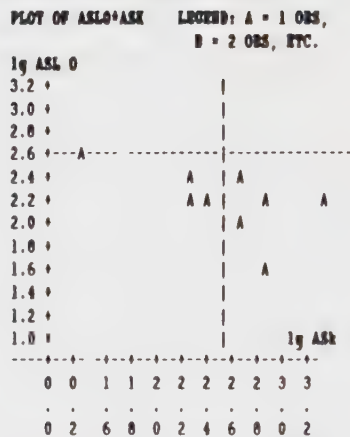


Abb. 15: Korrelation der ASk- und ASL 0-Titer bei unkomplizierten Pyodermien mit einer Bestandsdauer < 2 Wochen

PLOT OF ASLO*ASK LEGEND: A = 1 OBS, B = 2 OBS, ETC.

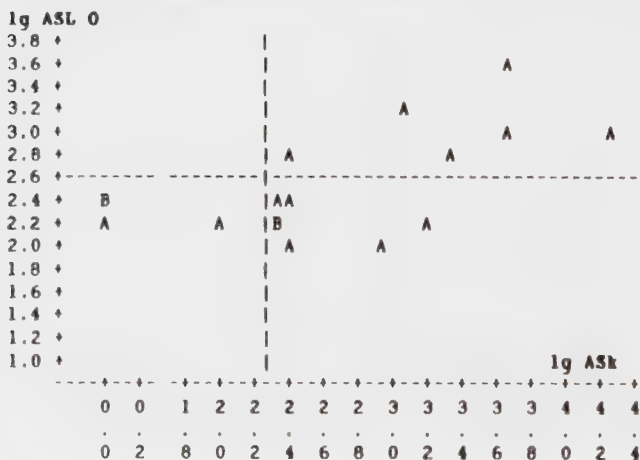


Abb. 16: Korrelation der ASk- und ASL 0 - Titer bei "komplizierten" Pyodermien mit einer Bestandsdauer > 2 Wochen

4.2. Diskussion

4.2.1. Die Anti-Streptolysin O-Reaktion (ASR) als ungeigneter Seronachweis bei Pyodermien

Das häufig beschriebene "Versagen" der Anti-Streptolysin O Reaktion v.a. bei Hauterkrankungen (2, 3, 12, 25, 41, 50, 71, 91, 106) spiegelt sich auch in den Ergebnissen dieser Studie, mit einem nur 30 %igen Anteil signifikant erhöhter ASL O-Titer wider (Abb.1).

Auch die Tatsache, daß bei Durchführung aller 5 Antikörpertests kein Serum ausschließlich in der ASR positiv war, läßt die ASR bei Pyodermien als ungeeignetes serologisches Nachweisverfahren erscheinen. (Bei der ADNase B- und ASk-Reaktion waren es immerhin 3,8 bzw. 7.7 % der getesteten Seren, die nur in diesen beiden Nachweisverfahren signifikant erhöhte Titer aufwiesen (Abb.5).

Fordert man für einen eindeutig positiven Seronachweis, daß mindestens 2 Antikörpertiter signifikant erhöht sein müssen, sind auch hier Dreierkombinationen mit gleichzeitiger Durchführung der ASR, bei einem serologischen Erfassungsgrad von kleiner 61 % ungeeignet. Die gleichzeitige Durchführung von ADNase B, ASk und ANADase weist immerhin 73 % aller getesteten Seren in mindestens 2 Nachweisverfahren als signifikant erhöht aus (Abb.3).

Als mögliche Ursache für die schwache ASL O-Immunantwort bei Pyodermien wurde mehrmals eine mögliche SL O-Hemmung in vivo durch Lipide und Cholesterol der Haut in Betracht gezogen (41, 42, 101, 102) und auch im Tierversuch bestätigt (42). Diese These kann durch diese Studie weder eindeutig untermauert noch abgelehnt werden:

Zwar konnte hier ein signifikant größerer Mittelwert für ASL O ermittelt werden, wenn die verursachenden Streptokokken unmittelbaren Kontakt zu tieferen Gefäßen der Haut besaßen, z.B. bei superinfizierten Ulcera crura, wobei der hemmende Einfluß des Cholesterin nicht so sehr zur Geltung gekommen sein dürfte. Auch der Anteil positiver ASL O-Titer war für diesen Fall höher (Tab.6a, 6b).

Dieser Mittelwertunterschied wird aber auch zu einem gewissen Teil durch die unterschiedliche Bestandsdauer der Erkrankung verursacht: So ist der Mittelwertunterschied zwischen verschiedenen Komplikationsgraden nur bei einer Bestandsdauer länger als 2 Wochen signifikant (s.Tab.6c). Außerdem ist nur bei "komplizierten" Pyodermien ein Mittelwertunterschied zwischen den ASL O-Titern verschiedener Bestandsdauer erkennbar, aber nicht signifikant ($p\text{-Wert} > 0.2862$, s.Tab.6e). Dies heißt, daß z.B. Patienten mit superinfizierten ulcera crura öfter und länger A-Streptokokken ausgesetzt waren und so die Immunantwort auf ASL O ausgeprägter ausfiel. Allerdings war diese Abhängigkeit für andere Antikörper-Titer nicht feststellbar.

Daß ein verzögerter ASL O-Anstieg für die geringe Immunantwort mitverantwortlich sein könnte, wird auch von Ragunath et al (71) in Betracht gezogen. Eine direkte Abhängigkeit der ASL O-Titer von der Bestandsdauer konnte aber in dieser Studie nicht festgestellt werden ($p\text{-Wert} > 0.8545$). Um dies zu klären, wäre die Durchführung von Verlaufskontrollen besser geeignet.

Das SL O-Bildungsvermögen der Streptokokken scheint für die geringe ASL O-Immunantwort nicht verantwortlich zu sein, da das in vitro-SL O-Bildungsvermögen der Stämme nicht mit der Immunantwort korreliert ist ($p\text{-Wert} > 0.4362$, s.6.1.1.).

Außerdem stellten Kaplan et al (41, 42) keine signifikanten Unterschiede im SL O-Produktionsvermögen zwischen Streptokokken von verschiedenen Isolationsorten fest.

4.2.2. Die Verteilung der Antikörpertiter und ihre Bedeutung für die Serodiagnostik

Der große Anteil signifikant erhöhter ADNase B-Werte (69%) bei Pyodermien, deckt sich mit den Ergebnissen anderer Autoren (12, 41, 57, 78, 91). Für diesen hohen Prozentsatz signifikant erhöhter ADNase B-Titer macht Tiesler das Verteilungsmuster der in vivo produzierten Nucleasen verantwortlich: So sollen bei Pyodermien hauptsächlich DNase B, an anderen Infektionsorten (z.B. Nasen- und Rachenraum) auch die Isoenzyme A, C und D gebildet werden (87).

In dieser Studie wurden von A-Streptokokken der Haut tatsächlich recht hohe DNase B-Mengen in vitro produziert (Abb.17).

Wie 6.1.2. zeigt, läßt sich auch eine signifikante Korrelation zwischen den ADNase B-Titern und dem DNase B-Produktionsvermögen in vitro erkennen (p -Wert < 0.036), wenn gewisse klinische Parameter berücksichtigt werden.

Größer als der Anteil signifikant erhöhter ADNase B-Titer, war der Prozentsatz signifikant erhöhter ANADase-Titer (72%), was sich ebenfalls mit den Ergebnissen von Tiesler (91) deckt, während der Anteil signifikant erhöhter AHyase-Titer mit 48% deutlich hinter seinen Ergebnissen (85%) zurückbleibt. Dies kann u.a. auf die Abhängigkeit der AHyase-Titer von der Bestandsdauer der Erkrankung (p -Wert < 0.043 , s.Tab.6a und 6b) zurückzuführen sein.

Möchte man mit serologischen Tests eine Streptokokkengenesse von Pyodermien überprüfen, so entdeckt man mit der gemeinsamen Durchführung der ASk-/ANADase-Reaktion mehr in mindestens einem Test "positive" Seren (insgesamt 92.9 %), als durch die Bestimmung von ASL O/AHyase/ADNase B und ASk (91,8%, s.Abb.2 u.4).

Durch die Kombinationen ADNase B/ASk/ANADase, ADNase B/ASk/ANADase/AHyase sowie ADNase B/ASk/ANADase/ASL O konnten alle bakteriologisch gesicherten Pyodermien auch serologisch in mindestens einem Test erfaßt werden, wobei ASk- und ANADase-Nachweis das größte Spektrum positiver Titer umfassen und zusammen mit dem ADNase B-Nachweis auch die meisten in mindestens zwei Tests erhöhten Antikörperwerte liefern (73 %, Abb.2 u. 3).

Da die ASR jedoch häufig als erster Antikörpertest durchgeführt wird, sollte bei Pyodermien als Zweitreaktion der ANADase-Nachweis mit 54% oder der ADNase B-Nachweis mit 49% zusätzlich zur ASR signifikant erhöhten Antikörperwerten erfolgen (Abb.2).

4.2.3. Einfluß klinischer Parameter auf die Immunantwort

Die Behauptung von Köhler (51), daß zwischen den ASL O-

Titern und der Schwere des Krankheitsverlaufes kein Zusammenhang besteht, kann durch diese Studie für Pyodermien nicht generell bestätigt werden. Wie schon oben erwähnt, sind die Mittelwerte für ASL O signifikant größer (p -Wert < 0.027), wenn die Streptokokken unmittelbaren Kontakt zu tieferliegenden Hautgefäßen hatten. Auch der Anteil signifikant erhöhter ASL O-Titer ist für diesen Fall größer. Dies mag vielleicht in der SL O-Hemmung durch Lipide der Haut seine Ursache haben, die in tieferen Hautschichten sich nicht so stark auswirken dürfte. Aber auch das längere Bestehen der Erkrankung bei Patienten mit superinfizierten "offenen" Wunden spielt hier eine Rolle (Tab.6a-e).

Einen begünstigenden Effekt auf die ASL O-Immunantwort scheint auch eine gleichzeitig bestehende Infektion durch *Staph.aureus* auszuüben:

Für den Fall, daß gleichzeitig *Staph.aureus* Begleitkeime nachgewiesen wurden, lagen signifikant höhere ASL O-Mittelwerte vor (p -Wert < 0.0006 , Tab.6a). Möglicherweise vermindern Exoenzyme von *Staph.aureus* Hemmfaktoren gegen SL O in vivo. Auch eine Veränderung der in vivo SL O-Produktion der Streptokokken über eine Genomveränderung unter dem Einfluß von *Staph.aureus* wäre denkbar.

Zum Teil ist dies aber auch auf die längere Bestandsdauer zurückzuführen. Dies heißt, daß Patienten bei denen Begleitkeime nachgewiesen werden konnten, im Regelfall unter länger bestehenden Infektion oder Rezidiven litten und sich dadurch auch eine höhere ASL O-Immunantwort ergab (s.Tab.6c-e).

Obwohl die A-Streptokokken, die von diesen länger bestehenden Effloreszenzen isoliert wurden, signifikant höhere SL O-Mittelwerte besaßen (s.5.1.5.1.), ist der signifikant höhere ASL O-Mittelwert für länger bestehende Effloreszenzen wahrscheinlich nicht auf die SL O-Produktionsfähigkeit in vitro zurückzuführen, da diese mit der Immunantwort nicht signifikant korreliert ist (p -Wert > 0.4362), sondern eher auf den Immunmechanismus des Patienten.

Dies wird auch dadurch bestätigt, daß keine signifikant höheren SL 0-Mittelwerte bei "komplizierten" Pyodermien oder Pyodermien mit Staph.aureus als Begleitkeim ermittelt wurden (p-Wert > 0.155 bzw. > 0.386).

Die von Bisno et al (12) festgestellte Abhängigkeit der AHyase-Titer von der Häufigkeit/Persistenz der Hauterkrankungen, läßt sich auch durch diese Studie belegen: So besteht ein signifikant erhöhter AHyase-Mittelwert bei einer Bestandsdauer > 2 Wochen (p-Wert < 0.0424). Auch der Anteil signifikant erhöhter AHyase-Titer ist bei länger anhaltenden Pyodermien wesentlich größer (53%), als bei kürzerer Bestandsdauer (29 %, s.Tab.6a und b).

Der signifikant erhöhte AHyase-Mittelwert von Patienten mit atopischer Diathese (p-Wert < 0.0095), der sich auch in einem wesentlich größeren Anteil signifikant erhöhter AHyase-Titer zeigt, ist vor allem durch die längere Bestandsdauer bedingt (Tab.6c und e).

Die Hyase-Produktion der Streptokokken kann hierfür nicht verantwortlich gemacht werden, da sie bei Stämmen, die von Atopikern isoliert wurden, signifikant niedriger ist (p-Wert < 0.0376 , s.5.1.5.2.).

Sowohl für die ASL 0- als auch für die ASk-Titer wurden für die Altersgruppe 0 (Kinder, Jugendliche jünger als 18 Jahre und Patienten älter als 50 Jahre) signifikant höhere Mittelwerte festgestellt, als für die Altersgruppe 1 (Patienten zwischen 18 und 50 Jahren); p-Wert < 0.0082 für ASL 0 bzw. < 0.0072 für ASk (Tab.6a). Auch der Anteil signifikant erhöhter AK-Titer war für die Altersgruppe 0 wesentlich größer (s.Tab.6b).

Dies ist zum Teil durch die längere Bestandsdauer der Erkrankung bei Patienten der Altersgruppe 0 bedingt (Tab.6e u.4). Das Signifikanzniveau für einen Mittelwertunterschied zwischen den unterschiedlichen Bestandsgruppen in der Altersgruppe 0 ist allerdings recht gering (p-Wert > 0.4018 für ASL 0 bzw. > 0.6259 für ASk), so daß auch noch andere Faktoren eine Rolle spielen müßten. Dies wäre in einer gesonderten Studie mit höherer Fallzahl und Messung des Titerverlaufes zu untersuchen.

Eine ursächliche Beteiligung der Enzymproduktionsfähigkeit scheidet hier ebenfalls aus (p-Wert für MW-unterschiede bei verschiedenen Altersgruppen > 0.5279 für SL 0 bzw. > 0.8513 für Sk).

4.2.4. Die Korrelation der Antikörpertiter

4.2.4.1. Ohne Berücksichtigung klinischer Parameter

Betrachtet man die Pearsonschen Korrelationskoeffizienten zwischen den verschiedenen Antikörpern, ohne klinische Parameter zu berücksichtigen, so stellt man eine höchst-signifikante positive Korrelation der AHyase und ADNase B-Werte fest (p-Wert < 0.0002). Dies drückt sich auch in einer 71 %igen Übereinstimmung positiver und negativer Antikörpertiter aus, wie sich aus den Werten der Abb.2 errechnen läßt.

Diese gleichgerichtete Immunantwort scheint jedoch nicht auf das Enzymbildungsvermögen der Streptokokken zurückzuführen zu sein, da die in vitro produzierten Hyase-/DNase B-Mengen signifikant negativ korreliert sind (p-Wert < 0.02 , s.Tab.12 und Abb.19). Allerdings korreliert die in-vitro-Hyase-Produktion nicht mit der AHyase-Immunantwort (Korr.K. = -0.20371 , p-Wert > 0.1093 , Tab.13).

Es bestehen möglicherweise erhebliche Unterschiede zwischen dem in vitro und dem in vivo Hyase-Produktionsvermögen. Wahrscheinlich beruht die hohe Korrelation der AHyase- und ADNase B-Werte auf einem ähnlichen Zeitverlauf der Enzymsynthese und der Immunantwort in vivo. Um dies zu untermauern, müßten Messungen von Ak-Titerverläufen durchgeführt werden, da die hier ermittelten Antikörpertiter nur ein momentanes Bild des z.T. individuell stark verschiedenen zeitlichen Verlaufs der Immunantwort vermitteln. Die Durchführung von Titerverlaufskontrollen erweist sich allerdings organisatorisch als schwer durchführbar. Zudem werden diese Titerverläufe auch durch andere Faktoren (z.B. Antibiotikatherapie) beeinflusst.

Auch die fast signifikante Korrelation der ANADase-/ADNase B-Werte (p -Wert < 0.0508 , Tab.7) drückt sich in der (2.höchsten) Übereinstimmung positiver und negativer AK-Titer aus (69 %, s.Abb.2).

Die etwa gleichgerichtete ASL O-/ASk-Immunantwort wurde schon von Köhler (51) erwähnt.

Die geringe Korrelation der ASL O-/AHyase-Werte (p -Wert > 0.7673) deckt sich mit den Ergebnissen von Faber (25).

Eine geringere Korrelation der ASL O-/ADNase B-Titer bei Hautkrankheiten stellte auch Scheffel fest (78), während ein gleichsinniger AHyase-/ASk-Anstieg (2) für Pyodermien nicht festzustellen ist.

(KorrK. = -0.00438 , p -Wert > 0.9729).

4.2.4.2. Auswirkung klinischer Faktoren auf die Korrelation der Antikörpertiter

In 2.5., 4.2.1. und 4.2.3. wurde bereits erwähnt, daß die AK-Titer in unterschiedlichem Ausmaß von verschiedenen Faktoren beeinflußt werden. Dies wirkt sich natürlich auch auf die Korrelation der verschiedenen Antikörperwerte aus: So findet sich zwischen den ASL O-/ANADase-Werten nur für den Fall, daß keine Staph.aureus Begleitkeime nachgewiesen werden konnten eine signifikante positive Korrelation (Tab.8, Abb.8).

Gleiches gilt für die ASL O-/ADNase B- und ADNase B-/ANADase-Titer weiblicher Patienten (s.Tab.8 und Abb.9). Möglicherweise werden durch Staph.aureus nicht nur die Vermehrung der A-Streptokokken, sondern auch deren Enzymsynthese in vivo und die Immunantwort auf Exoenzyme der Streptokokken beinflußt.

Die stärkere Abhängigkeit der ASL O-Titer von der Bestandsdauer könnte erklären, daß nur bei länger bestehenden Infektionen (Bestg=1) eine signifikante positive Korrelation zwischen den ASL O- und ADNase B-Werten zu errechnen war (p -Wert < 0.0454), während sich bei einer Bestandsdauer < 2 Wochen eine signifikant negative Korrelation zwischen beiden Titer ergab (p -Wert < 0.004 , s.Abb.12 u.13, Tab.9).

Eindeutiger wäre dieser Sachverhalt aber durch Verlaufs-kontrollen zu klären.

Ein ähnlicher Trend ist zwischen den ASL O- und ANADase-Werten (s.Tab.9), sowie zwischen den ASL O- und ASk-Werten (s.Tab.9, Abb.15 und 16) festzustellen.

Bei der Korrelation der ASk-/ASL O-Werte macht sich wohl auch der Einfluß des Komplikationsgrades bemerkbar: So findet man wesentlich höhere Mittelwerte für ASL O (p-Wert < 0.0269) und ASk (p-Wert < 0.0617), wenn die Streptokokken Kontakt zu tieferen Hautgefäßen besaßen ("Komplik=1").

Da für die ADNase B-Titer diese Abhängigkeit nicht besteht (p-Wert > 0.3223), ist es auch nicht verwunderlich, daß hier ein umgekehrtes Korrelationsverhalten zwischen ASL O und ADNase B festzustellen ist (Tab.9 und Abb.14).

Bei Pyodermien mit großer Ausdehnung ist eine signifikante Korrelation der ASL O-/ANADase-Werte auffallend (p-Wert < 0.0259), während die ADNase B-/ANADase-Werte nur bei Pyodermien geringer Ausdehnung korrelieren (Tab.8, Abb.10 und 11). Da hier keine signifikanten Mittelwertunterschiede für ASL O, ADNase B und ANADase bestehen (p-Werte > 0.8680 , 0.8962 , 0.1740), könnten hierfür unterschiedliche Enzymproduktionsmuster in vivo verantwortlich sein.

4.3. Zusammenfassung

Bei 63 Patienten mit Pyodermien wurden Antikörpertiter gegen extrazelluläre Stoffwechselprodukte der A-Streptokokken, die aus dem erkrankten Hautareal isoliert werden konnten, bestimmt.

Die Immunantwort wurde unter Berücksichtigung klinischer Parameter statistisch analysiert. Man erhielt eine sehr geringe ASL O-Antwort, mit nur 30 Prozent signifikant erhöhten Antikörperwerten und eine hohe ASk-, ADNaseB- und ANADase-Antwort, mit 60, 69 und 71 % signifikant erhöhten Werten.

Mit den drei letztgenannten Testverfahren konnten alle bakteriologisch nachgewiesenen Pyodermien auch serologisch erfaßt werden, d.h. 100 % der Seren waren in mindestens einem dieser drei Test signifikant erhöht.

Für einige klinische Faktoren konnte ein möglicher Einfluß auf die Immunantwort nicht ausgeschlossen werden.

So konnten signifikant höhere AHase-Titer bei längerer Bestandsdauer und bei atopischer Diathese festgestellt werden. Der zuletzt genannte Sachverhalt ist größtenteils ebenso auf die längere Bestandsdauer zurückzuführen.

Die ASL O-Werte lagen signifikant höher, wenn die Streptokokken direkten Kontakt zu tieferliegenden Blutgefäßen der Haut besaßen, sowie bei gleichzeitig anwesenden Staph. aureus im erkrankten Hautbezirk. Für ASL O und ASk konnten signifikant höhere Antikörpermittelwerte für Patienten unter 18 und über 50 Jahren ermittelt werden.

Alle 4 Mittelwertunterschiede ließen sich nur zu einem gewissen Teil durch die meist gleichzeitig aufzufindende längere Bestandsdauer der Erkrankung erklären.

Eine signifikante gleichsinnige Verteilung der Antikörpertiter war ohne Berücksichtigung klinischer Parameter nur zwischen den AHase- und ADNase B-Werten festzustellen. Bei länger bestehenden Erkrankungen, sowie bei fehlendem Begleitkeimnachweis erwiesen sich auch die ASL O-/ANADase-, ASL O-/ADNase B- und die ANADase-/ADNase B-Titer als signifikant korreliert.

Unter Berücksichtigung der Ausdehnung der Erkrankung und des Komplikationsgrades (Kontakt der Keime zu tieferen Hautschichten) erhielt man signifikante gleichgerichtete Immunantworten auch für ASL O/ANADase, ANADase/ADNase B, ASL O/ADNase B und ASL O/ASk.

5. Enzymaktivität der Gruppe A-Streptokokken in vitro

5.1. Ergebnisse

5.1.1. Verteilung der Enzymmengen

Einen Überblick über die produzierten Enzymmengen (SL 0, Hyase, DNase B und Sk) verschafft das Scattergramm in Tab.10.

(80	..		) 1600	.. *****	) = 1200	***
(40	.. ***** *****		(1600	**** ***** *****	(1200	****
	.. ***** *****	) 20	(800	* ***** ***** *****	(600	** *****
(20	.. ***** *****	..	..	..	(300	*** ***** *****
(10	.. ***** *****	(20	(400	**** *****	(150	***** ***** *****
(6	.. *****	*	(100	**** *****	(5	* ***** ***** *****
(1	.. *****	(5	(10	*** *****	(5	***** ***** *****
SL 0	Hyase	DNase B	Sk			

Tab.10: Produzierte Enzymmengen

5.1.2. Prozentsatz geringer, mittlerer und hoher Enzymproduktion innerhalb der einzelnen Enzymgruppen

Wie aus den Balkendiagrammen der Abb.17 ersichtlich ist, produzieren die aus den Pyodermiebezirken isolierten A-Streptokokken nur wenig Hyase, mittelmäßig viel SL O und Sk, und in großen Mengen DNase B.

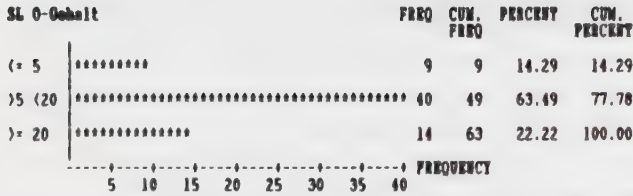
5.1.3. Enzymbildungsvermögen der Streptokokken

Das Verteilungsmuster geringer ("0") mittlerer ("1") und hoher ("2") Produktion extrazellulärer Substanzen ist in Abb.18 festgehalten. Aus dieser Aufstellung läßt sich errechnen, wieviel Stämme 1, 2, 3 oder 4 Enzyme gleichzeitig in mittleren bis großen Mengen produzieren:

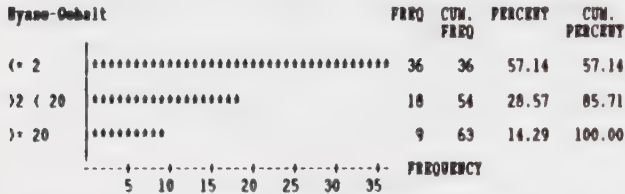
Anzahl produzier- ter Exoenzyme	produzierte Enzymmenge	Anzahl der Stämme	Prozent- satz (ca)
1 Exoenzym	mittel	2	3.2
	hoch	2	3.2
2 Exoenzyme	mittel	3	4.8
	hoch	17	27.0
3 Exoenzyme	mittel	22	35.0
	hoch	5	7.9
4 Exoenzyme	mittel	9	14.3
	hoch	3	4.8

Tab.11: Enzymbildungsvermögen der Hautstreptokokken

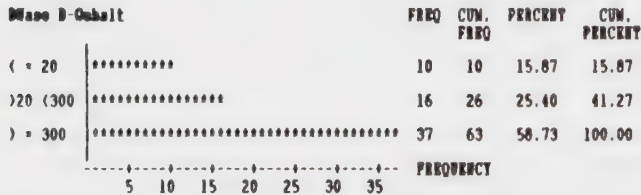
Jeder Stamm produzierte in vitro mindestens 1 Exoenzym in meßbaren Konzentrationen.



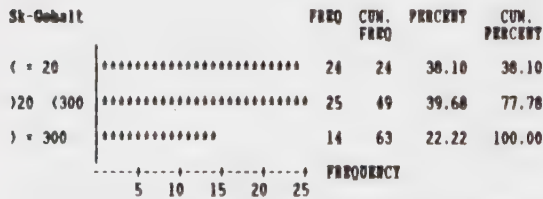
Prozentsatz geringer, mittlerer und hoher Streptolysin O-Produktion



Prozentsatz geringer, mittlerer und hoher Hyaluronidase-Produktion



Prozentsatz geringer, mittlerer und hoher Mase B-Produktion



Prozentsatz geringer, mittlerer und hoher Streptokinase-Produktion

Abb.17: Prozentsatz geringer, mittlerer und hoher Produktion extrazellulärer Substanzen von Gruppe A-Streptokokken in vitro

SLG	SLGG	HYALG	DNBG	FREQUENCY	PERCENT	CUMULATIVE FREQUENCY	CUMULATIVE PERCENT
0	0	0	2	1	1.6	1	1.6
0	1	0	0	2	3.2	3	4.8
0	1	0	1	2	3.2	5	7.9
0	1	0	2	5	7.9	10	15.9
0	1	1	1	2	3.2	12	19.0
0	1	1	2	3	4.8	15	23.8
0	1	2	1	1	1.6	16	25.4
0	2	0	0	1	1.6	17	27.0
0	2	0	1	2	3.2	19	30.2
0	2	0	2	3	4.8	22	34.9
0	2	1	1	1	1.6	23	36.5
0	2	1	2	1	1.6	24	38.1
1	0	0	1	1	1.6	25	39.7
1	0	0	2	2	3.2	27	42.9
1	0	1	2	1	1.6	28	44.4
1	1	0	1	1	1.6	29	46.0
1	1	0	2	6	9.5	35	55.6
1	1	1	1	1	1.6	36	57.1
1	1	1	2	6	9.5	42	66.7
1	1	2	0	4	6.3	46	73.0
1	2	0	2	1	1.6	47	74.6
1	2	1	2	1	1.6	48	76.2
1	2	2	0	1	1.6	49	77.8
2	0	0	2	4	6.3	53	84.1
2	1	0	0	1	1.6	54	85.7
2	1	0	1	1	1.6	55	87.3
2	1	0	2	1	1.6	56	88.9
2	1	1	1	2	3.2	58	92.1
2	1	2	0	1	1.6	59	93.7
2	1	2	1	1	1.6	60	95.2
2	2	0	2	2	3.2	62	98.4
2	2	2	1	1	1.6	63	100.0

Abb.16: Enzymbildungsvermögen der Gruppe A-Streptokokken

5.1.4. Korrelation zwischen den in vitro produzierten Koenzym- bzw. Exotoxinsengen

Wie die nachstehende Korrelationstabelle zeigt, ist keine signifikante positive Korrelation zwischen den in vitro produzierten SL O-, Hyase-, DNase B- und Sk-Mengen feststellbar (Tab.9).

Die Hyase- und DNase B-Produktion sind sogar negativ korreliert, d.h. daß bei den untersuchten Stämmen mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0.02$ bei einer hohen DNase B-Produktion mit einer geringen Hyase-Produktion in vitro gerechnet werden kann und umgekehrt (s.s. Abb.19).

VARIABLE	N	MEAN	STD DEV	SUM	MINIMUM	MAXIMUM
SL O	63	1.1608552	0.4117915	73.13388	0	1.8750613
HYAL	63	0.5887869	0.7201143	37.09358	0	1.8450980
DN B	63	2.2499793	1.0189509	141.74870	0	3.2833012
SK	63	1.5050674	1.1652674	94.81925	0	3.2041200

PEARSON CORRELATION COEFFICIENTS/ PROB >|R| UNDER H₀:RHO=0/ N=63

	SLO	HYAL	DNB	SK
SLO	1.00000 0.0000	0.18356 0.1498	-0.18516 0.1463	-0.23451 0.0643
HYAL	0.18356 0.1498	1.00000 0.0000	-0.29374 0.0195	0.16431 0.1981
DNB	-0.18516 0.1463	-0.29374 0.0195	1.00000 0.0000	-0.09476 0.4601
SK	-0.23451 0.0643	0.16431 0.1981	-0.09476 0.4601	1.00000 0.0000

Tab.12: Korrelation zwischen den in vitro produzierten
Exoenzym- bzw. Exotoxinnengen

PLOT OF HYAL*DNB LEGEND: A = 1 OBS,
B = 2 OBS, ETC.

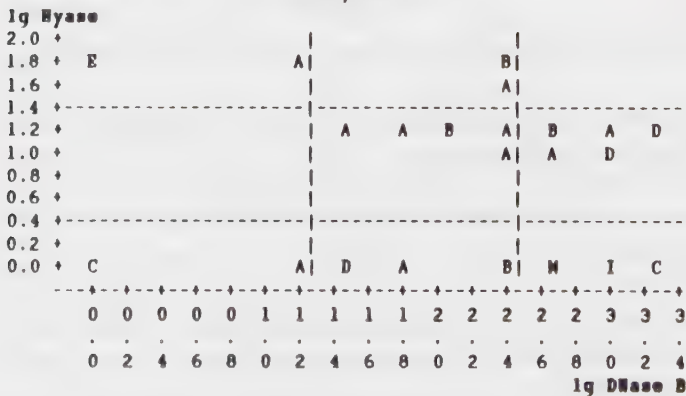


Abb.19: Negativkorrelation der in vitro produzierten
Hyase-/DNase B-Mengen

5.1.5. Möglicher Einfluß der Enzymproduktionsfähigkeit auf klinische Parameter

5.1.5.1. und 5.1.5.2. zeigen signifikante Mittelwertunterschiede der Exoenzymbildung bei verschiedenen klinischen Parametern.

5.1.5.1. Möglicher Einfluß der Streptolysin O-Produktion auf die Restandsdauer der Erkrankung

TTTEST PROCEDURE for VARIABLE: SL O

BESTG	N	MEAN	STD DEV	STD ERROR	MINIMUM	MAXIMUM
0	14	0.91360869	0.55314610	0.14783451	0	1.57978360
1	49	1.23149702	0.33651102	0.04807300	0	1.87506126

VARIANCES ? DF PROB > |T|

UNEQUAL -2.0449 15.0 0.0579

EQUAL -2.6703 61.0 0.0097

FOR H0: VARIANCES ARE EQUAL, F' = 2.70 WITH 15 AND 48 DF
PROB > F' = 0.0124



**5.1.5.2. Hyaluronidaseproduktion der A-Streptokokken
isoliert von Patienten mit oder ohne atopischer Diathese**

TTTEST PROCEDURE for VARIABLE: HYase

ATOPIC	N	MEAN	STD DEV	STD ERROR	MINIMUM	MAXIMUM
0	41	0.73020961	0.72902336	0.11385432	0	1.84509804
1	21	0.34071350	0.64934470	0.14169863	0	1.84509804

VARIANCES T DF PROB > |T|

UNEQUAL	2.1420	44.8	0.0376
EQUAL	2.0633	60.0	0.0434

FOR H0: VARIANCES ARE EQUAL, F' = 1.26 WITH 40 AND 20 DF
PROB > F' = 0.5884

		FREQ	HYAL MEAN
1- Mit		21	0.340714
0- Ohne		41	0.730210
atopischer	----- ----- ----- ----- ----- ----- -----		
Diathese	0.1 0.2 0.3 0.4 0.5 0.6 0.7		HYASE MEAN

5.2. Diskussion

5.2.1. Die Enzymproduktion von A-Streptokokken der Haut *in vitro*

In den Exoenzymkonzentraten der hier untersuchten 63 Stämme wurde eine mäßige SL O-, Hyase- und Streptokinase-Aktivität und ein gutes DNase B-Bildungsvermögen festgestellt:

Die geringe SL O-Aktivität von Hautstreptokokken der Gruppe A wurde auch von Tiesler (93) ermittelt. Allerdings können auch A-Streptokokken von anderen Isolationsorten nur eine geringe SL O-Aktivität aufweisen (103). Zudem stellten Kaplan et al (41, 42) keine signifikanten Unterschiede in SL O-Produktionsvermögen zwischen A-Streptokokken verschiedener Herkunft fest, so daß die geringe SL O-Aktivität zum Teil durch das verwendete Konzentrationsverfahren (irreversible Inaktivierung des SL O durch Sauerstoff) und die Kulturbedingungen (z.B. Sistieren der SL O-Produktion bei pH-Abfall (17)) bedingt sein könnte.

Die geringe Hyase-Aktivität der hier getesteten A-Streptokokken deckt sich mit den Untersuchungen anderer Autoren über das *in vitro*-Produktionsvermögen von Hautstreptokokken (7, 103, 105). Diese geringe Hyase-Aktivität wird wahrscheinlich auch durch die Kulturbedingungen, zu kurze Inkubationszeit (Optimum liegt bei 36 Stunden (51, 66, 94)), das Nährmedium (so sollen Bestandteile der Hyaluronsäure die Hyase-Produktion vermindern, während Hyaluronsäure- und Serumzusatz jene fördern sollen (37, 66))

und das angewandte Testverfahren bedingt sein: Benchetrit (7) konnte mittels photoelektrischer Messung der Hyaluronsäure bei 143 von 147 A-Streptokokken Hyase nachweisen, während dies Gerlach und Köhler nur bei 9 von 40 Stämmen gelang (27). Bei 55 von 63 A-Streptokokkenstämmen konnte DNase B nachgewiesen werden. Hierbei produzierten 16 Stämme (=25 %) mittelmäßig viel und 37 Stämme (=59 %) sehr viel DNase B. Diese hohe DNase B-Aktivität, die sich auch in den hohen ADNase B-Titern widerspiegelt, wurde auch von Tiesler festgestellt (87).

Von 63 A-Streptokokkenstämmen produzierten 42 (=67 %) Streptokinase, davon allerdings nur 14 (=22 %) in hohem Ausmaß. Bei allen untersuchten Stämmen konnte in vitro mindestens ein Exoenzym/Exotoxin nachgewiesen werden. 39 Stämme (=62 %) bildeten mindestens 3 Exoenzyme in mittleren bis großen Mengen.

5.2.2. Korrelation der in vitro produzierten Enzymmengen

Es konnte keine signifikante positive Korrelation zwischen den produzierten Enzymmengen festgestellt werden. Für die SL O- und Sk-Produktion ist sogar eine negative Korrelation mit einem p-Wert < 0.065 errechenbar, was die Ergebnisse von Tillet et al (94) bestätigt.

Ein signifikant negativer Korrelationskoeffizient (p-Wert < 0.0196) besteht zwischen der Hyase und DNase B-Produktion in vitro. Möglicherweise findet in vitro eine gegenseitige Beeinträchtigung der Enzymproduktion statt. Ob dies in vivo ähnlich ist scheint fraglich, zumal die ADNase B- und AHyase-Antikörpertiter sehr gut miteinander korreliert sind. (p-Wert < 0.0001)

5.2.3. Möglicher Einfluß der Enzymproduktionsfähigkeit auf das Krankheitsbild

Signifikante Mittelwertunterschiede der Enzymwerte für verschiedene klinische Parameter konnten nur in zwei Fällen ermittelt werden: So produzierten A-Streptokokken, die von länger bestehenden Pyodermien isoliert wurden, signifikant mehr Streptolysin O in vitro. Wie 4.2.3. erläutert, hatte dies aber keinen oder nur geringen Einfluß auf die ASL O-Immunantwort und auf andere klinische Parameter. Es scheint eher wahrscheinlich, daß die Stämme im Laufe längerer Infektionen ein ausgeprägteres SL O-Produktionsvermögen erworben haben, sofern man das in vitro- mit dem in vivo-Produktionsvermögen vergleichen darf.

Ähnlich ist das niedrigere Hyase-Produktionsvermögen der Stämme, die von Atopikern isoliert wurden, zu bewerten. (s.a.4.2.3.)

5.9. Zusammenfassung

Bei 63 Streptokokkenstämmen der Gruppe A wurde die Enzymaktivität in vitro bestimmt und ihr möglicher Einfluß auf klinische Parameter untersucht.

Es wurde eine geringe Hyase-, mäßige SL O- und Sk- sowie eine hohe DNase B-Aktivität der Stämme ermittelt.

Jeder Stamm produzierte in vitro mindestens ein Exoenzym in meßbaren Konzentrationen.

39 Stämme (=62%) bildeten mindestens 3 Exoenzyme in mittleren und großen Mengen.

Eine signifikante positive Korrelation zwischen den in vitro produzierten SL O-, Hyase-, DNase B- und Sk-Mengen konnte nicht festgestellt werden. Die DNase B- und die Hyase-Produktion in vitro waren sogar signifikant negativ korreliert.

In vivo scheinen allerdings andere Produktionsmuster vorzuliegen, da die AHyase- und ADNase B-Immunantwort sehr gut übereinstimmen (p-Wert < 0.0001).

Es konnte kein signifikanter Einfluß der Enzymproduktionsfähigkeit in vitro auf klinische Parameter, wie z.B. Ausdehnung und Komplikationsgrad der Erkrankung festgestellt werden.

PLOT OF HYASE+AHYASE LEGEND: A = 1 OBS,
B = 2 OBS, ETC.

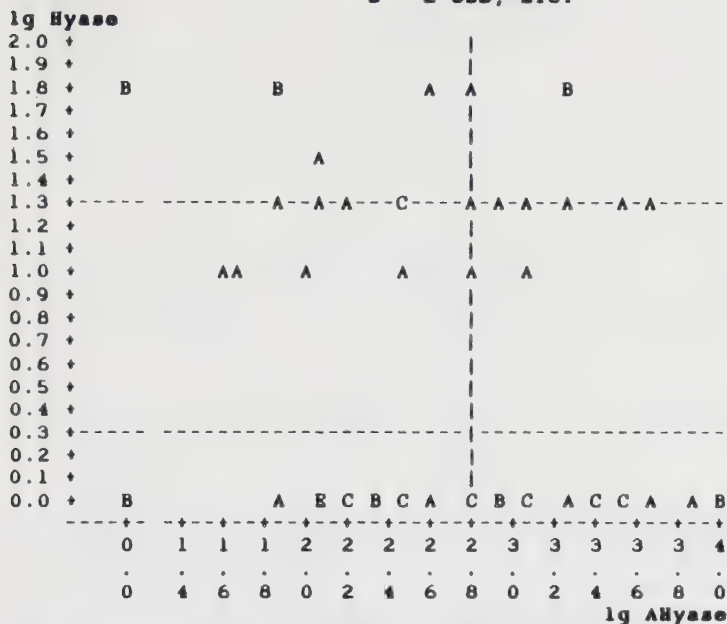


Abb.21: Verteilung der AHyase-/Hyase-Titer

PLOT OF DNaseB+ADNaseB LEGEND: A = 1 OBS,
B = 2 OBS, ETC.

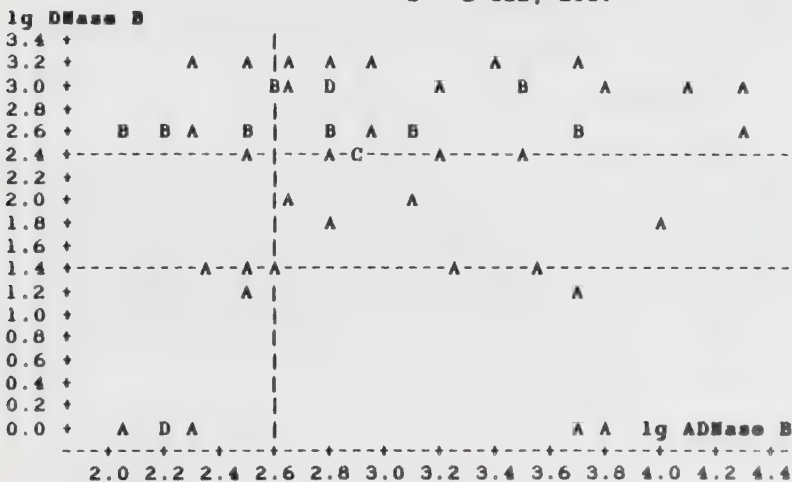


Abb.22: Verteilung des ADNase B-/DNase B-Gehalts



Abb.23: Verteilung des ASk-/Sk-Werte

6.1.2. Korrelation zwischen Immunantwort in vivo und Exoensym-/Exotoxinproduktion in vitro unter Berücksichtigung klinischer Parameter

6.1.2.1. Einfluß des Faktors Begleitkeim

Konnte bei dem Hautinfekt zusätzlich *Staphylococcus aureus* nachgewiesen werden, so sind die Hyase-Produktion in vitro und die AHyase-Titer im Serum signifikant (p -Wert < 0.007) negativ korreliert, d.h. Stämme mit höherem Hyasebildungsvermögen erzeugten im Schnitt eine geringere Immunantwort, als solche mit geringer Hyaseaktivität in vitro.
(S. Tab.14 und Abb.24)

Auf die Korrelation des ADNase B-Gehalts mit der DNase B-Enzymproduktion in vitro wirkt sich die Anwesenheit von Staph.aureus jedoch entgegengesetzt aus, d.h. die Immunantwort entspricht bei gleichzeitiger Anwesenheit dieses Begleitkeim im erkrankten Hautbezirk eher dem Toxinbildungsvermögen der verursachenden Streptokokken (p-Wert < 0.0341 , s.Tab.14 und Abb.25).

6.1.2.2. Einfluß des Komplikationsgrades

Hatten die Streptokokken unmittelbaren Kontakt zu tiefer liegenden Gefäßen, so sind die erhaltenen AHyase-Titer negativ mit dem Hyase-Bildungsvermögen in vitro korreliert (p-Wert < 0.0051 , s.Tab.14 und Abb.26).

Die ADNase B- und DNase B-Werte zeigen ein umgekehrtes Verhalten (s.Tab.14 u.Abb.27).

6.1.2.3. Einfluß von Begleitkeimen unter Berücksichtigung des Komplikationsgrades

Die Ermittlungen von 6.1.2.1. und 6.1.2.2. werden auch bei der Berücksichtigung beider Parameter bestätigt (s.Tab.14, sowie Abb.28 u.29).

6.1.2.4. Einfluß von Begleitkeimen unter Berücksichtigung der Geschlechterverteilung

Bei weiblichen Patienten war die Korrelation zwischen ADNase B und DNase B bei Abwesenheit von Staph.aureus signifikant negativ, bei Anwesenheit dagegen signifikant positiv (p-Wert < 0.0431 , s.Tab.14 sowie Abb.30 u.31).

6.1.2.5. Einfluß des Komplikationsgrades unter Berücksichtigung der Bestandsdauer

Wie sich die Bestandsdauer auf die Korrelation der AHyase-/Hyase- bzw. der ADNase B-/DNase B-Werte auswirkt, vermitteln Tab.14 und die Abb.32 und 33.

Antikörper-/ Enzymnachweis	Korrelations- koeffizient	p- Wert	Fre- quenz	klinische Parameter
AHyase/Hyase	0.11720	0.5025	35	BKeim = 0
AHyase/Hyase	-0.50726	0.0069	27	BKeim = 1
AHyase/Hyase	0.05967	0.7109	41	Komplik=0
AHyase/Hyase	-0.60134	0.0050	20	Komplik=1
AHyase/Hyase	0.06766	0.7323	28	BK=0&Ko=0
AHyase/Hyase	-0.76439	0.0023	13	BK=1&Ko=1
AHyase/Hyase	0.55717	0.1191	9	Ko=0&Be=0
AHyase/Hyase	0.00303	0.9869	32	Ko=0&Be=1
AHyase/Hyase	-0.61828	0.0082	17	Ko=1&Be=1
ADNaseB/DNaseB	-0.01608	0.9292	33	BKeim = 0
ADNaseB/DNaseB	0.40927	0.0340	27	BKeim = 1
ADNaseB/DNaseB	-0.01984	0.9046	39	Komplik=0
ADNaseB/DNaseB	0.47165	0.0358	20	Komplik=1
ADNaseB/DNaseB	-0.08490	0.6801	26	BK=0&Ko=0
ADNaseB/DNaseB	0.53232	0.0611	13	BK=1&Ko=1
ADNaseB/DNaseB	-0.21832	0.6035	8	Ko=0&Be=0
ADNaseB/DNaseB	0.00543	0.9769	31	Ko=0&Be=1
ADNaseB/DNaseB	0.48255	0.0498	17	Ko=1&Be=1
ADNaseB/DNaseB	-0.45794	0.0423	20	BK=0&SX=0
ADNaseB/DNaseB	0.51108	0.0430	16	BK=1&SX=0

Tab.14: Korrelation der AHyase/Hyase- und ADNase B/DNase B-Werte unter Berücksichtigung der Parameter Begleitkeim (=BKeim=BK), Komplikationsgrad (=Komplik=Ko), Geschlechtsverteilung(=Sx) und Bestandsdauer (=Be)

PLOT OF NYASE*ANYASE

LEGEND: A = 1 OBS,
B = 2 OBS, ETC.

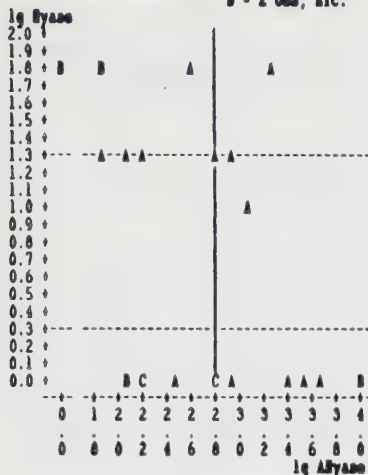


Abb. 24: Korrelation der NYase-/Anyase-Werte bei positivem Nachweis von Staph. aureus in erkrankten Rattenzür

PLOT OF MaseB*AMaseB

LEGEND: A = 1 OBS,
B = 2 OBS, ETC.

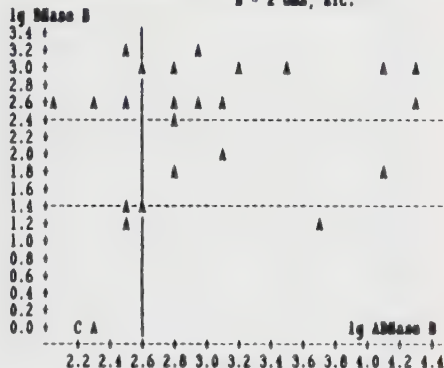


Abb. 25: Korrelation der AMase B-/Mase B-Werte bei positivem Nachweis von Staph. aureus in erkrankten Rattenzür

PLOT OF NYASE*ANYASE

LEGEND: A = 1 OBS,
B = 2 OBS, ETC.

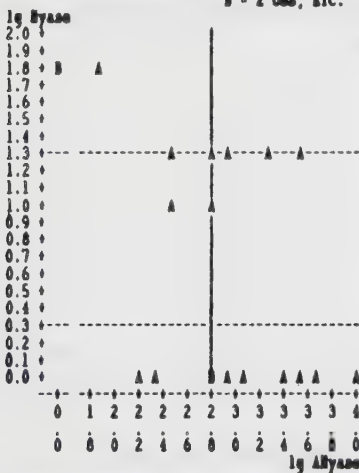


Abb. 26: Korrelation der NYase-/Anyase-Werte bei "impliziert verlaufenden" Pyodermien

PLOT OF MaseB*AMaseB

LEGEND: A = 1 OBS,
B = 2 OBS, ETC.

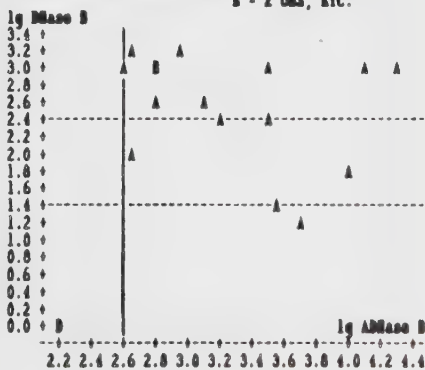


Abb. 27: Korrelation der AMase B-/Mase B-Werte bei "impliziert verlaufenden" Pyodermien

PLOT OF ANYASE*BYASE LEGEND: A = 1 OBS,
B = 2 OBS, ETC.



Abb.28: Korrelation der ANYase-/BYase-Werte bei "implizierten" Pyodermie mit positivem Begleitthrombozytose

PLOT OF MaseB*AMaseB LEGEND: A = 1 OBS,
B = 2 OBS, ETC.

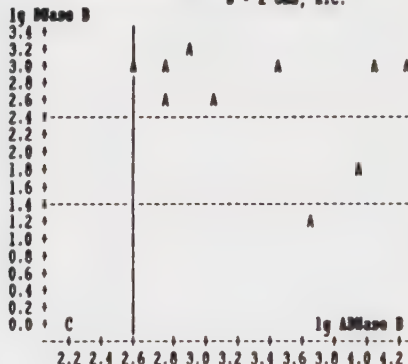


Abb.29: Korrelation der AMase B-/Mase B-Werte bei "implizierten" Pyodermie mit positivem Begleitthrombozytose

PLOT OF MaseB*AMaseB LEGEND: A = 1 OBS,
B = 2 OBS, ETC.

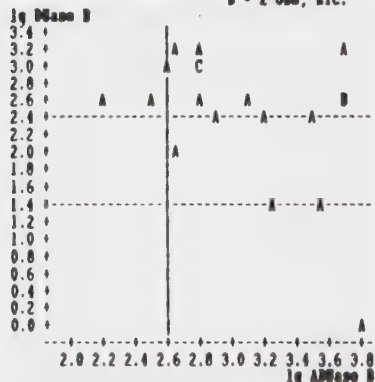


Abb.30: Korrelation der AMase B-/Mase B-Werte bei Pyodermie von weiblichen Patienten mit negativem Begleitthrombozytose

PLOT OF MaseB*AMaseB LEGEND: A = 1 OBS,
B = 2 OBS, ETC.

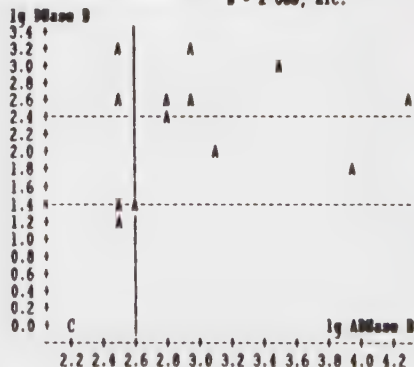


Abb.31: Korrelation der AMase B-/Mase B-Werte bei Pyodermie von weiblichen Patienten mit positivem Begleitthrombozytose

PLOT OF BYASE*BYASE LEGEND: A = 1 OBS,
B = 2 OBS, ETC.

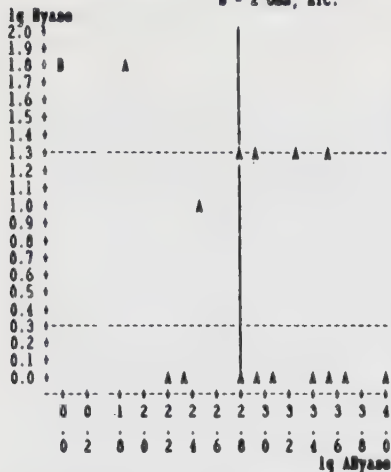


Abb. 32: Korrelation der ABYase/BYase-Werte
bei "komplizierten" Pyoderminen mit einer
Bestandsdauer von mehr als 2 Wochen

PLOT OF MaseB*ABMaseB LEGEND: A = 1 OBS,
B = 2 OBS, ETC.

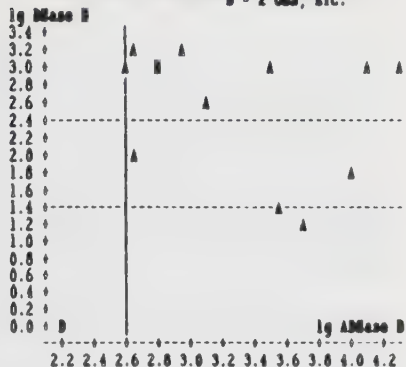


Abb. 33: Korrelation der ABMase B-/Mase B-Werte
bei "komplizierten" Pyoderminen mit einer
Bestandsdauer von mehr als 2 Wochen

6.2. Diskussion

Betrachtet man die Ergebnisse in Tab.13 so stellt man fest, daß kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Enzymsynthese in vitro und der in vivo Immunantwort besteht. Dies bestätigt die Ergebnisse von Kaplan (41, 42) für ASL O/SL O, Bernhard (9) für AHyase/Hyase, Mc Carthy (59) für ADNase B/DNase B und ASk/Sk. Ähnlich sollen sich die ANADase-/NADase-Werte verhalten (9).

Da jedoch in vivo Exoenzym- bzw. Exotoxinsynthese unter anderen Voraussetzungen stattfindet (vgl. 5.2.1.) muß der eingeschlagene Weg, einen unmittelbaren Zusammenhang zwischen Synthese und Immunantwort aufzuzeigen, folglich als bedingt tauglich angesehen werden. Er wäre nur im Falle einer signifikanten Korrelation erfolgreich gewesen.

Da auch die Immunantwort von unterschiedlichen klinischen Faktoren und der Bestandsdauer der Erkrankung abhängen kann, wurde dieser Aspekt hier mit berücksichtigt:

Auf die Korrelation der ASL O-/SL O- und ASk-/Sk-Werte hatten die verschiedenen Parameter, wie z.B. Ausdehnung, Komplikationsgrad und Bestandsdauer der Erkrankung jedoch keinen signifikanten Einfluß. Wie bereits oben erwähnt, mag dies einerseits durch die Kulturbedingungen und die Enzympräparation bedingt sein. Für den geringen Zusammenhang zwischen ASL O und SL O vor allem bei Pyodermien wird andererseits von manchen Autoren (41, 42, 71, 101, 102) eine SL O-Hemmung in vivo durch Cholesterin der Haut angeschuldigt. Obwohl in dieser Studie signifikant höhere Mittelwerte für ASL O ermittelt wurden, wenn die Keime tiefere Hautschichten erreichten und somit die Cholesterinhemmung geringer gewesen sein dürfte, hatte dies auf die Korrelation der ASL O-/SL O-Werte keinen signifikanten Einfluß.

Die AHyase-/Hyase-Werte sind allerdings für diesen Fall signifikant negativ korreliert. Gleiches gilt für den Fall, daß Staph.aureus Begleitkeime nachgewiesen werden konnten. Beide Faktoren wirken in der selben Richtung, wie Tab.14

vermittelt, da für den Fall komplizierter Pyodermien, bei gleichzeitiger Anwesenheit von Staph.aureus die höchste Signifikanz (p-Wert < 0.0023) ermittelt wurde.

(S. Abb.24, 26 und 28)

Möglicherweise wird in tieferen Hautschichten und durch Staph.aureus die in-vivo-Hyase-Produktion beeinträchtigt, so daß eine geringere AHyase-Immunantwort erfolgt. Dies könnte z.B. durch eine negative Rückkopplung durch die Staph.aureus Hyase erfolgen. Durch die Bestandsdauer der Erkrankung kann dies allerdings nicht erklärt werden, da diese negative Korrelation nur bei länger bestehenden Erkrankungen signifikant ist (s.Tab.14), und somit eine verzögerte Immunantwort als Ursache für diesen negativen Zusammenhang ausscheidet. Es wäre höchstens denkbar, daß das Hyase-Produktionsvermögen mit zunehmender Dauer der Infektion abnimmt.

Umgekehrt Verhalten sich allerdings die ermittelten ADNase B- und DNase B-Werte.

(S.Tab.14 u. Abb. 25, 27, 29, 30, 31 u. 33)

Hier erhält man signifikant positive Korrelationen, wenn staph.aureus Begleitkeime vorlagen und die Streptokokken Kontakt zu tieferen Hautschichten besaßen. Wie Tab.14 zeigt sind beide Faktoren gleichgerichtet. Bei weiblichen Patienten erhält man zudem signifikant negative Korrelationskoeffizienten, wenn Staph.aureus nicht nachweisbar war. Einen zum Komplikationsgrad gleichgerichteten Einfluß auf die Korrelation der ADNase B-/DNase B-Werte übt die Bestandsdauer der Erkrankung aus. So erhält man einen negativen Korrelationskoeffizienten für "unkomplizierte" Pyodermien geringer Bestandsdauer, während bei "komplizierten" Pyodermien längerer Bestandsdauer der Korrelationskoeffizient signifikant positiv ist. Wahrscheinlich wird durch Staph.aureus, Kontakt zu tieferen Hautgefäßen und durch den Einfluß der Bestandsdauer der Immunmechanismus eher dem auslösenden Enzym gerecht, oder die Enzymsynthese in vivo wird verbessert. Signifikant höhere Mittelwerte für ADNase B konnten bei Berücksichtigung der 3 Parameter in vivo allerdings nicht ermittelt werden.

6.3. Zusammenfassung

Betrachtet man nur die ermittelten Antikörper- und Enzymwerte so läßt sich keine signifikante Korrelation zwischen der in-vitro-Enzymsynthese und der Immunantwort feststellen, vermutlich weil die Enzymsynthese in vitro und in vivo unterschiedlichen quantitativen Aspekten folgt. Berücksichtigt man allerdings klinische Parameter so stellt man fest, daß die AHyase-/Hyase-Titer bei Pyodermien, bei denen Staph.aureus Begleitkeime nachgewiesen wurden, sowie bei superinfizierten Hautpartien mit freiliegenden tieferen Hautgefäßen und bei gleichzeitig längerer Bestandsdauer der Erkrankung signifikant negativ korreliert sind.

Zwischen den ADNase B-/DNase B-Werten sind für die gleichen Bedingungen signifikant positive Korrelationskoeffizienten ermittelbar.

Möglicherweise wird durch diese Faktoren die in-vivo-Enzymsynthese bei der Hyase beeinträchtigt, bei der DNase B eher gefördert. Für die Immunantwort konnten für diese Faktoren keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Bei 63 Patienten mit Pyodermien wurden Antikörpertiter gegen extrazelluläre Stoffwechselprodukte der A-Streptokokken, die aus dem Hautareal isoliert werden konnten, bestimmt. Ferner wurde die Enzymaktivität der Stämme in vitro ermittelt und analysiert, ob ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Immunantwort und der Enzymsynthese festzustellen ist.

Die Immunantwort wurde unter Berücksichtigung klinischer Parameter statistisch analysiert. Man erhielt eine sehr geringe ASL O-Antwort, mit nur 30 Prozent signifikant erhöhten Antikörperverten und eine hohe ASK-, ADNase B- und ANADase-Antwort, mit 60, 69 und 71 % signifikant erhöhten Werten. Mit den drei letztgenannten Testverfahren konnten alle bakteriologisch nachgewiesenen Pyodermien auch serologisch erfaßt werden.

Als sinnvollste Ergänzung der ASR zum serologischen Nachweis von Pyodermien erwies sich der ANADase-FT, mit 54 % zusätzlich zur ASR "positiven" Werten, gefolgt von ADNase B- (49%), ASK- (41%) und AHyase-Nachweis (32%).

Für einige klinische Faktoren konnte ein möglicher Einfluß auf die Immunantwort nicht ausgeschlossen werden. So konnten signifikant höhere AHyase-Titer bei längerer Bestandsdauer und bei atopischer Diathese festgestellt werden. Signifikant erhöhte ASL O-Mittelwerte lagen vor, wenn die Streptokokken Kontakt zu tieferliegenden Blutgefäßen der Haut besaßen, sowie bei gleichzeitig anwesenden Staph. aureus im erkrankten Hautareal.

Eine signifikant gleichsinnige Verteilung der Antikörperverte war ohne Berücksichtigung klinischer Parameter nur zwischen den AHyase- und ADNase B-Werten festzustellen. Berücksichtigte man klinische Parameter, wie Dauer, Ausdehnung und Komplikationsgrad der Erkrankung, erhielt man auch signifikant gleichgerichtete Immunantworten für ASL O/ANADase, ASL O/ADNase B, ADNase B/ANADase und ASL O/ASK.

Die isolierten A-Streptokokken-Stämme besaßen eine geringe Hyase-, mäßige SL O- und Sk- sowie eine hohe DNase B-Aktivität in vitro. Jeder Stamm produzierte in vitro mindestens ein Exoenzym in meßbaren Konzentrationen. 39 Stämme (=62%) bildeten mindestens 3 Exoenzyme in mittleren und großen Mengen.

Eine signifikante Korrelation zwischen den in vitro produzierten SL O-, Hyase-, DNase B- und Sk-Mengen konnte nicht festgestellt werden.

Ein Zusammenhang zwischen der Enzymproduktionsfähigkeit in vitro und klinischen Parametern konnte nicht ermittelt werden.

Betrachtet man nur die ermittelten Antikörper- und Enzymwerte, so läßt sich keine signifikante Korrelation zwischen der in-vitro-Enzymsynthese und der Immunantwort feststellen, vermutlich weil die Enzymsynthese in vitro und in vivo unterschiedlichen quantitativen Aspekten folgt.

Berücksichtigt man bestimmte klinische Parameter, so stellt man fest, daß die AHyase-/Hyase-Titer signifikant negativ, die ADNase B-/DNase B-Werte signifikant positiv korreliert sind.

B. LITERATURVERZEICHNIS

1. Alouf, J.E.; Raynaud, M.: Purification and some properties of Streptolysin O.
Biochimie 55: 1187-1193 (1973)
2. Alouf, J.E.; de Saint Martin, J.; et al : Titrage des anticorps sérique humains anti-exoprotéines du streptocoque du groupe A par microhémagglutination en plaque: corrélation avec les taux de l'anti-streptolysin O et de divers anti-enzymes.
Ann.Microbiol. (Paris) 129 A: 447-472 (1978)
3. Anthony, B.F.; Lawrence; Perlman; Wannamaker: Skin infections and acute nephritis in american indian children. Pediatrics 39, 2: 263-279 (1967)
4. Ayoub, E.M.; Wannamaker, L.W.: Evaluation of the streptococcal deoxyribonuclease B and diphosphoridine nucleotidase antibody tests in acute rheumatic fever and acute glomerulonephritis.
Pediatrics 29: 527-538 (1962)
5. Benchetrit, L.C.; Edstrom; Gray; Wannamaker: Purification and characterisation of a hyaluronidase associated with a temperate bacteriophage of group A, type 49 streptococci.
J.Bact.134, 1: 221-228 (1978)
6. Benchetrit, L.C.; Gray; Wannamaker: Immunological of hyaluronidase associated with temperate bacteriophages of group-A-streptococci.
J.Exp.Med.149, 1: 73-83 (1979)
7. Benchetrit, L.C.; Avelino, C.C.; et al: Hyaluronidase production by groups A, B, C and G streptococci: A statistical analysis.
Zbl.Bakt.Hyg.A 257: 27-37 (1984)

8. Bergholm, A.W.; Holm, S.E.: Demonstration of streptococcal antigens produced in vivo and identification of a nephritis associated protein.
Acta path.microbiol.immunol.scand.sect.B 93, 4: 297-306 (1985)
9. Bernhard, G.C.; Stollerman, G.H.: Serum inhibition of streptococcal diphosphopyridine nucleotidase in uncomplicated streptococcal pharyngitis and in rheumatic fever.
J.Clin.Invest.38: 1942-1949 (1959)
10. Bernheimer, A.W.: Hemolysins of Streptococci: Characterization and effects on biological membranes.
In: Wannamaker and Matsen: Streptococci and streptococcal diseases, Chapter 2: 19-31 New York Academic Press (1972)
11. Bhakdi, S.; Roth, M.; Sziegoleit; Tranum-Jensen: Isolation and identification of two hemolytic forms of streptolysin O.
Infection and Immunity 46, 2: 394-400 (Nov.1984)
12. Bisno, A.L.; et al: Factors influencing serum antibody responses in streptococcal pyoderma.
J.Lab.Clin.Med.81, 3: 410-420 (1973)
13. Böszörményi, J.: Simplified method for the routine determination of antistreptokinase titre.
Z.Immunforschung 124: 411-418 (1962)
14. Bogdanovscky, J.; Giraud, M.; Torlotin, J.C.: Micro-method determination of antistreptohyaluronidase.
Pharm.Biol.139: 239-241 (1982)
15. Bradford, M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding.

16. Christensen, L.R.: Methods for measuring the activity of components of the streptococcal fibrinolytic system and streptococcal deoxyribonuclease.
J.Clin.Invest.28: 163-171 (1949)
17. Dassay, B.; Alouf, J.E.: Growth of streptococcus pyogenes and streptolysin O production in complex and synthetic media.
J.Gen.Microbiol.129, Pt3: 643-651 (1983)
18. Daviaud, J.; Fournet; et al: Coordinated evaluation of commercial reagents for the titration of anti-streptolysin O, antistreptodornase and antistreptokinase antibodies.
Pharm.Biol.157: 155-166 (1985)
19. Duran Reynals, F.: The extent of local dispersion of infectious agents as a factor in resistance to infection.
J.Exp.Med.161: 617-642 (1933)
20. Dykewicz, M.S.; Mc Grath; Harris, K.E.; Patterson, R.: Immunologic responses to intravenous streptokinase in dogs.
Int.Archs Allergy appl.Immun.78: 386-390 (1985)
21. Eiken Chemical Co.Ltd.: Sensitized latex reagent for detection of antistreptokinase.
Jpn. Kokai Tokkyo Koho, JP 59/73765 A 2 (1984)
22. Engvall, E.; Perlmann, P.: Ensym-linked-immunosorbent-assay, ELISA III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled antiimmunoglobulin in antigen-coated tubes.
J.Immunol.109: 129-135 (1972)
23. Faber, V.: Streptococcal hyaluronidase.
Acta Path.Microbiol.Scand.31: 345-354 (1952)

24. Faber, V.: Antistreptococcal hyaluronidase. I. The turbidimetric method for determination of antistreptococcal hyaluronidase (ASH) in serum. Acta Path.Microbiol.Scand.32: 147-156 (1953)
25. Faber, V.: Antistreptococcal hyaluronidase IV. Comparison of antistreptococcal hyaluronidase and antistreptolysin O in sera from patient with rheumatic fever, glomerulonephritis, tonsillitis and rheumatoid arthritis. Acta.Medica Scand.147: 299-310 (1953)
26. Gerber, M.: Diagnosis of group A beta-hemolytic streptococcal pharyngitis, use of antigen detection tests. Diagn.Microbiol.Infect.Dis.4: 5S-15S (1986)
27. Gerlach, D.; Köhler, W.: Hyaluronatlyase von Streptococcus pyogenes. I. Bildung und Isolierung II. Charakterisierung der Hyaluronatlyase Zbl.Bakt.Hyg.I.Abt.Orig.A 221: 166-172 und 296-302 (1972)
28. Gerlach, D.; Köhler, W.: Untersuchungen zur Heterogenität von Streptokinasen verschiedener Herkunft. Zbl.Bakt.Hyg.I.Abt.Orig.A 238: 336-349 (1977)
29. Gerlach, D.; Köhler, W.: Untersuchungen zur Heterogenität von Streptokinasen. II.Mitteilung: Aminosäurezusammensetzung und serologische Aktivität III. Mitteilung: Aggregatbildung bei Streptokinasen. Zbl.Bakt.Hyg.I.Abt.Orig.A 244: 210-221 und 222-228 (1979)
30. Ginsburg, I.: Mechanisms of cell and tissue injury by group A streptococci: Relation to a poststreptococcal sequelae. J.Infect.Dis.126, 3: 294-327 (1972)

31. Gray, E.D.: Nucleases of group A streptococci.
In: Wannamaker and Matsen: Streptococci and streptococcal diseases.
New York Academic Press.Ch.9: 143-155 (1972)
32. Gross, W.: Lymphozytenantwort auf bakterielle Biostrukturen: Vorläufer infekti-induzierter Immunphänomene und Wachkrankheiten ?
Immun.Infekt.14, 1: 37-44 (1986)
33. Grushoff, Ph.S.; Shany; Bernheimer: Purification and properties of streptococcal nicotinamide adenine dinucleotide glycohydrolase.
J. Bacteriol.122: 599-605 (1975)
34. Gupta, R.C.; et al: Detection of C-reactive protein, streptolysin O, and antistreptolysin O antibodies in immun complexes isolated from sera of patients with acute rheumatic fever.
J.Immunol.137, 7: 2173-2179 (1986)
35. Harris, S.; Harris, T.M.: The measurement of neutralizing antibodies to streptococcal hyaluronidase by a turbidimetric method.
J.Immunol. 63: 233-247 (1949)
36. Heymer, B.: Pathogenitätsfaktoren beta-hämolysierender Streptokokken.
Zbl.Bakt.Hyg.I.Abt.Orig.A 227: 150-158 (1974)
37. Hill, J.: Purification and properties of streptococcal hyaluronat lyase.
J.Infect.Immun.14, 3: 726-735 (1976)
38. Hirst, G.K.: The effect of a polysaccharide-splitting enzyme on streptococcal infection.
J.Exp.Med.73: 493-505 (1941)

39. Hryniewicz, W.; Gray; Tagg; Wannamaker:
Streptolysin S: Purification and properties.
Zbl.Bakt.Hyg.I.Abt.Orig.A 242, 3: 327-338 (1978)
40. Javetz; Melnick, Adelberg: Die Streptokokken.
In: Medizinische Mikrobiologie: 239-248 (1980),
5. Auflage, Springer Verlag
41. Kaplan, E.L.; Anthony; Chapman; Ayoub; Wannamaker: The
influence of the site of infection on the immune
response to group A streptococci.
J.Clin.Invest.49: 1405-1414 (1970)
42. Kaplan, E.L.; Wannamaker, L.W.: Streptolysin O:
Suppression of its antigenicity by lipids extracted
from skin.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med.146, 1: 205-208 (1974)
43. Kass, E.H.; Seastone: The role of the mucoid
polysaccharide (hyaluronic acid) in the virulence
of group A hemolytic streptococci.
J.Exp.Med.79: 319-330 (1944)
44. Keiichi, K.; Fumio, H.; et al: Effect of lipid in
blood on ASO measurement.
Eisei Kenka 32, 9: 1159-1165 (1983)
45. Kellner, A.; Freeman; Carlson: Neutralizing antibodies
to streptococcal diphosphopyridine nucleotidase in
the serum of experimental animals and human beings.
J.Exp.Med.108: 299-309 (1958)
46. Kim, Y.B.; Watson: Streptococcal exotoxins: Biological
and pathological properties.
In: Wannamaker and Watsen: Streptococci and
Streptococcal Diseases:
Chapter 3: 33 - 55 (1972) New York Academic Press.

47. Klein, G.C.; Jones: Comparison of the streptozyme test with the antistreptolysin O, antidesoxyribonuclease B and antihyaluronidase tests.
Appl.Microbiol.21, 2: 257-259 (1971)
48. Klein, G.C.; Baker; Jones: Upper limits of "normal" antistreptolysin O and antidesoxyribonuclease B titers.
Appl.Microbiol.21, 6: 999-1001 (1971)
49. Klein, G.C.: Evaluation of the Wampole Streptodnase B test. J.Clin.Microbiol.Vol.6, 5: 533 (1977)
50. Knöll, K.: Die Bestimmung der Streptokokkenantihyaluronidase, ein Trübungsverminderungstest mittels Streptokokkenhyaluronsäure.
Z.Immunitätsforschung 142: 276-283 (1971)
51. Köhler, W.: Die Serologie des Rheumatismus und der Streptokokkeninfektionen.
In: Beiträge zur Hygiene und Epidemiologie, v. Habs u. Kahte, Leipzig, Barth (1963)
52. Kröger, E.; Eilers: Zur Serodagnostik des rheumatischen Fiebers Ergebnisse von Antistreptolysin- und Antistreptokokken-NADase-Reaktion.
Kratl.Lab.17: 155-160 (1971)
53. Kunitz, M.: Crystalline desoxyribonuclease.
I. Isolation and general properties. Spectrophotometric method for the measurement of desoxyribonuclease activity. II. Digestion of thymus nucleic acid (DNA). The kinetics of the reaction.
J.Gen.Physiol.33: 349-377 (1950)
54. Kurnick, N.B. The determination of desoxyribonuclease activity by methyl green; application to serum.
Arch.Biochem.Biophys.29: 41-53 (1950)

55. Lancefield, R.C.: A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. J.Exp.Med.57: 571-594 (1933)
56. Lütticken, R.und D.; Johnson; Wannamaker: Application of a new method for detecting streptococcal nicotinamide adenine dinucleotide glycohydrolase to various M types of streptococcus pyogenes. J.Clin.Microbiol.5: 533-536 (1976)
57. Lütticken, R.; Wannamaker; Kluitmann; Neugebauer; Pulverer: Antikörper gegen Streptococcus-pyogenes-Exoenzyme: ASL O, Anti-DNase B und Streptoxyme-Test. Dtsch.med.Wachr.101: 958-963 (1976)
58. Madinaveitia, J.; Quibell: Studies on diffusing factors. 6. The action of testicular extracts on the viscosity of vitreous humor preparations. Biochem.J.34: 625-631 (1940)
59. Mc Carty, M.: The inhibition of streptococcal deoxyribonuclease by rabbit and human antisera. J.Exp.Med.90: 543-553 (1949)
60. Meigel, W.; Deindl: Der Latex-ASL-Test. Erfahrungen mit einer Objektträger Schnellmethode zur raschen Abgrenzung überhöhter Antistreptolysintiter. MMW 4: 198-202 (1969)
61. Mosimann, J.; Brunner: Gruppierung beta-hämolysierender Streptokokken der Gruppen A, B, C, G mit dem Phadebact Streptococcus Test. Zbl.Bakt.Hyg.I.Abt.Orig.A 245: 25-32 (1979)
62. Muzykantov, V.R.; Sakharov, D.V.; et al: Immunotargeting of erythrocyte-bound streptokinase provides local lysis of a fibrin clot. Biochim.Biophys.Acta. 884, 2: 355-362 (1986)

63. Petersen, K.F.; Kröger; Rotthauwe: Untersuchungen über die Streptokokken-Diphosphopyridinnucleotidase. I. Partielle Reinigung und Characterisierung des Enzyms.
Z.Hyg.Infekt.Kr.147: 350-356 (1961)
64. Petersen, K.F.: Fortschritte auf dem Gebiet der Serodiagnose der Streptokokkeninfektionen.
Arztl.Lab.12, 7: 189-200 (1966)
65. Peuckert, W.: Mikrobiologie der Streptokokkeninfektionen.
Klin.Pädiatr.197, 1: 5-8 (1985)
66. Pike, R.M.: Streptococcal hyaluronic acid and hyaluronidase. I. Hyaluronidase activity of noncapsulated group A streptococci
II. Production and subsequent destruction of hyaluronic acid by certain strains of group A streptococci. III. Virulence of group A streptococci for mice in relation to the production and destruction of hyaluronic acid.
J.Infect.Dis.83, 1: 1-22 (1948)
67. Potter, E.; Moran: Extracellular factors, blood group antigens and bacteriophage of nephritogenic and nonnephritogenic strains of type M 12 streptococci.
J.Infect.Dis.Vol.140, 3: 392-396 (1979)
68. Quinn, R.W.: Studies on the mucin-clot prevention test for the determination of the antihyaluronidase titer of human serum.
J.Clin.Invest.27: 463-470 (1948)
69. Quinn, R.W.: The antihyaluronidase content of human blood serum.
J.Immunol.61: 185-191 (1949)

70. Quinn, R.W.; Sung Liao: A comparative study of anti-hyaluronidase, antistreptolysin O, antistreptokinase and streptococcal agglutination titers in patients with rheumatic fever, acute hemolytic streptococcal infections, rheumatoid arthritis and non-rheumatoid forms of arthritis.
J.Clin.Invest.29: 1156-1166 (1950)
71. Ragunath, K.R.; Chopra, T.R.: Bacteriology and serology of streptococcal pyoderma.
Indian J.Med.Res.82: 495-497 (Dec.1985)
72. Reitano, M.; Pisano, M.A.; Eriques; D'Amato, R.F.: Enzym-linked immunosorbent assay for detection of streptolysin O antibodies.
J.Clin.Microbiol.23, 1: 62-65 (1986)
73. Rosner, R.: Laboratory Evaluation of a rapid four hour serological grouping of groups A, B, C, G beta streptococci by the Phadebact streptococcus test.
J.Clin.Microbiol.6, 1: 23-26 (1977)
74. Rott: Group and type (group A and B) identification of haemolytic streptococci. Methods in Microbiology Vol.16: Ch.8: 177-197 (1984)
75. Russell, B.; Sherwood: Studies on streptococci: II. The role of hyaluronidase in experimental streptococcal infection. J.Infect.Dis.84: 81-87 (1949)
76. Russell, B.; Sherwood: Studies on streptococci: III. The role of hyaluronidase in experimental streptococcal infection.
J.Immunolog.61: 185-191 (1949)
77. Rykner, G.: Titration immunologique des antistreptolysines (ELISA).
Pathol.Biol.28, 8: 555-556 (1980)

78. Scheftel, J.M.: Intérêt de la détermination simultanée des antistreptolysines et des antidésoxyribonucléases B dans les affections streptococciques. *Ann.Biol.Clin. (Paris)* 37, 4: 207-212 (1979)
79. Senitzer, D.; Freimer, E.H.: Autoimmune mechanisms in the pathogenesis of rheumatic fever. *Rev.Infect.Dis.* 6, 6: 832-839 (1984)
80. Shany, C.J.; Grushoff; Bernheimer: Physical separation of streptococcal nicotinamide adenine dinucleotide glycohydrolase from streptolysin O. *Infect.Immun.* 7: 731-734 (1973)
81. Slifkin, M.; Engwall; Pouchet: Direct-plate serological grouping of beta-hemolytic streptococci from primary isolation plates with the Phadebact streptococcus test. *J.Clin.Micr.* 7, 4: 356-360 (1978)
82. Smyth, C.J.; Arbuthnott: Properties of clostridium perfringens alpha-toxin purified by electrofocusing. *J.Med.Micr.* 7: 45 (1974)
83. Smyth, C.J.; Fehrenbach: Isoelectric analysis of haemolysins and enzymes from streptococci of groups A, C and G. *Acta Path.Microbiol.Scand.Sect.B* 82: 860-870 (1974)
84. Spector, Th.: A sensitive protein assay. *Anal.Biochem.* 86: 142 (1978)
85. Stoner, R.A.: Bacitracin and coagglutination for grouping of beta-hemolytic streptococci *J.Clin.Microbiol.* 7, 5: 463-466 (1978)
86. Stringer, J.: Phage typing of streptococcus agalactiae. *Methods in Microbiology* 16: 1-21 (1984). Academic Press London

87. Tiesler, E.; Beck: Die Verteilung der Isoenzyme der Nucleasen bei A-Streptokokken.
Zbl.Bakt.Hyg.I.Abt.Orig.A 234: 462-472 (1976)
88. Tiesler, E.; Zolfaghari:
Der Antistreptodornase-B-Titer.
Arztl.Lab.19: 267-272 (1973)
89. Tiesler, E.; Merklen: Die initialen Phasen einer Infektion mit beta-hämolysierenden Streptokokken der Gruppe A beim Kaninchen unter besonderer Berücksichtigung der Streptodornase und Antistreptodornase. Zbl.Bakt.Hyg.I.Abt.Orig.A 226: 48-54 (1974)
90. Tiesler, E.: Ergänzende Diagnostik bei Verdacht auf A-Streptokokkenkrankungen.
Dtsch.Arzteblatt 47: 3239-3242 (1975)
91. Tiesler, E.; Hepp: Vergleich der Aussagekraft von vier immunologischen Nachweismethoden (AST, ADNase B, AHy, ANADase) bei A-Streptokokken-Infektionen und ihre Bedeutung für die Routinediagnostik.
Immunität und Infektion 4, 4: 190-195 (1976)
92. Tiesler, E.; Rummel; Kordovic; technische Mitarbeit: Heitzer: Grundlagen der Anti-NADase-Reaktion bei A-Streptokokken-Infektionen und deren Durchführung als Mikrotitertest.
Immunität und Infektion 4: 157-162 (1977)
93. Tiesler, E.; Trinks: Die Streptolysin O-Bildung beta-hämolysierender Streptokokken der Gruppe A.
Zbl.Bakt.Hyg.I.Abt.Orig.A 245: 17-24 (1979)
94. Tillett, W.S.; Garner: The fibrinolytic activity of haemolytic streptococci.
J.Exp.Med.58: 485-502 (1933)

95. Todd, E.W.: Antigenetic streptococcal haemolysin.
J.Exp.Med.55: 267-280 (1932)
96. Todd, E.W.: The haemolysin produced by streptococci
in serum media as an antigen and its effect on
antistreptolysin in vitro.
J.Path.Bact.36: 435-446 (1933)
97. Toth, T.; Gils, R.: Agent and method for determinig
anti-hyaluronidase.
Ger.Offen. DE 2915309: Oct 1980
98. Wannamaker, L.W.: The differentiation of three distinct
DNases of group A streptococci.
J.Exp.Med.107: 797-811 (1958)
99. Wannamaker, L.W.: Serum antibodies to streptococci in
rheumatic fever, glomerulonephritis and chorea.
Zbl.Bakt.I.Abt.Orig.214: 331-338 (1970)
100. Wannamaker, L.W.: The extracellular products of
group A streptococci.
In: Wannamker, Streptococcal diseases an the immune
response: 177-183 (1980) New York Academic Press.
101. Wannamaker, L.W.: Streptococcal toxins.
Rev.Infect.Dis.5, Suppl.4: 723-732 (1983)
102. Watson, K.C.; Kerr, E.J.C.: Specificity of antibodies
for T sites and F sites of streptolysin O.
J.Med.Microbiol.19, 1: 1-7 (1985)
103. Weber, T.F.: Extrazelluläre assoziierte Proteine
betähmolysierender Streptokokken.
Dissertation, Nr: 0700/UMB/00730 (1982)

104. Wilske, B.; Hilscher; Schierz: Ein Enzym-Immunoassay (ELISA) zum Nachweis von Antikörpern gegen Streptokokken-NADase.
Arztl.Lab.27: 63-68 (1981)
105. Wilske, B.; Schierz: Der Antihyaluronidase Test in der Serodiagnostik streptokokkenbedingter Erkrankungen.
Laboratoriumsblätter 31: 169-176 (1981)
106. Wilske, B.; Hilscher; Schierz: Der Anti-NADase-Nachweis und seine Bedeutung für die Serodiagnostik von Streptokokkeninfektionen.
Dissertation, Nr: 0700/UMB/03294 (1983)
107. Wooley, Ph.D.: A new growth factor required by certain haemolytic streptococci.
J.Exp.Med.73: 487-505 (1941)

LEBENS LAUF

Am 14. Juni 1959 wurde ich in Fürstenfeldbruck geboren. Vom September 1965 bis Juli 1969 besuchte ich die Volksschule und anschließend bis zum Abitur im Jahre 1978 das Graf-Rasso- Gymnasium in Fürstenfeldbruck. Meinen Grundwehrdienst leistete ich vom Juli 1978 bis September 1979 ab.

Im Wintersemester 1979/80 begann ich an der Ludwig-Maximilians-Universität in München das Studium der Zahnheilkunde, das ich am 24.7.1985 mit dem Bestehen der zahnärztlichen Prüfung abschloß. Die Approbation als Zahnarzt erhielt ich am 1.8.1985.

Seit 1.1.1986 bin ich als Assistenz Zahnarzt in München tätig.

